

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR)

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : « Chimie »

par

Anne-Cécile PETIT

Ingénieur ENSCR

UMR CNRS 6052 Synthèses et Activations de Biomolécules ENSCR
Laboratoire Biotechnologies et Molécules Marines de l'IFREMER (Nantes)
Ecole doctorale Sciences de la Matière
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes

MODIFICATIONS D'UN EXOPOLYSACCHARIDE BIOSYNTHÉTISÉ PAR UNE BACTÉRIE ISSUE DES ÉCOSYSTÈMES HYDROTHERMAUX PROFONDS

Soutenue le 16 décembre 2005 devant la Commission d'Examen

M. H. PATIN	Professeur à l'ENSC de Rennes UMR CNRS 6052	Président du Jury
Mme J. COURTOIS	Professeur à l'Université d'Amiens CNRS-FRE 2779	Rapporteur
M. A. THIBODEAU	Directeur des Affaires Scientifiques ATRIUM Biotechnologies, Québec	Rapporteur
M. N. GONDREXON	Professeur à l'Université de Grenoble 1 UMR 5631	Examineur
M. N. NOIRET	Chargé de Recherches CNRS à l'ENSC de Rennes UMR CNRS 6052	Directeur de Thèse
Mme S. COLLIEC-JOUAULT	Cadre de Recherches IFREMER, Nantes	Codirectrice de Thèse
M. J.P. HURVOIS	Maître de Conférences à l'Université de Rennes 1 UMR CNRS 6509	Membre invité

A Gabrielle, mon arrière-grand-mère

A Marc, mon grand-père

A ceux que j'aime et qui m'aiment...

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été réalisé dans le Laboratoire Synthèses et Activations de Biomolécules, associé au CNRS (UMR 6052) de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR) en collaboration étroite avec le Laboratoire Biotechnologies et Molécules Marines de l'Ifremer.

Madame le Professeur J. Courtois, de l'Université d'Amiens, et Monsieur A. Thibodeau, Directeur des affaires scientifiques d'ATRIUM Biotechnologies, ont accepté d'être les rapporteurs de cette commission d'examen. Qu'ils en soient vivement remerciés.

Je tiens également à remercier Monsieur H. Patin, Professeur à l'ENSC de Rennes, Monsieur J.P. Hurvois, Maître de Conférences à l'Université de Rennes 1, et Monsieur le Professeur N. Gondrexon, de l'Université de Grenoble 1, qui ont bien voulu juger ce travail.

Je suis reconnaissante à la société ATRIUM Biotechnologies pour la confiance qui m'a été accordée en permettant la poursuite de ces travaux après le rachat de la société Lanatech.

Je suis infiniment reconnaissante à Monsieur N. Noiret, Chargé de Recherches CNRS à l'ENSCR, qui, pendant 3 ans, par sa disponibilité, sa bonne humeur et son soutien, m'a aidée à surmonter les difficultés rencontrées en assurant le suivi au quotidien de ces recherches et la rédaction de ce mémoire.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à Madame S. Collic-Jouault, Cadre de Recherches à l'Ifremer et codirectrice de cette thèse, pour sa disponibilité, son intérêt constant pour ce travail et son implication avisée dans la correction de ce mémoire.

Je remercie tous les ingénieurs, chercheurs, techniciens et secrétaires des laboratoires de l'ENSCR et de l'Ifremer. Sans leur bienveillance, ni leur compétence et leur aide, ce travail n'aurait pu être mené à bien. Je tiens plus particulièrement à exprimer ma reconnaissance à Monsieur J.P. Guégan de l'ENSCR pour sa contribution importante à la partie RMN de cette thèse. Je tiens également à remercier Mesdames J. Ratiskol et C. Sinquin du centre Ifremer de Nantes dont les compétences ont souvent été mises à contribution.

Cette thèse a fait l'objet de plusieurs collaborations. Ainsi, je tiens à remercier vivement Monsieur N. Gondrexon pour nous avoir permis de réaliser un premier changement d'échelle de nos manipulations. Je remercie également Monsieur J.P. Hurvois pour les travaux de dépolymérisation par électrolyse réalisés au sein de son laboratoire. Mes remerciements vont également à Monsieur A. Bondon chercheur dans l'UMR CNRS 6026 de l'Université de Rennes 1 pour la réalisation de spectres

HRMAS et à Madame C. Rondeau, chercheur de la plate-forme RIO BIBS de l'INRA de Nantes pour l'enregistrement de spectres CPMAS.

Ces recherches ont également bénéficié des efforts de plusieurs étudiants (N. Völkel, S. Röper et G. Hersant) dans le cadre de stages de recherches et je voudrais leur adresser mes remerciements.

Je ne saurais oublier les bons moments passés avec mes voisins de paillasse et de bureaux : Bastien, Cécile, Céline, Fabien, Fabrice, Gérald, Gildas, Hervé, Holisoa, Isabelle, Karine, Marina, Mathieu, Myriam, Nicolas, Ronan, Sandrine, Vincent... merci à tous !

Je terminerai en remerciant les personnes qui, en dehors du contexte du travail, m'ont permis de mener à bien cette thèse. L'aboutissement de ces années d'étude n'aurait pu se faire sans l'aide d'Isabelle, ma Maman, de Thérèse, ma grand-mère, de ma sœur, Angèle, de mon Ami, Christophe, de Mylène et de tant d'autres... Un énorme merci à vous tous pour votre soutien sans faille.

Au cours de ce travail, les techniques suivantes ont été utilisées :

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

- Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés sur le spectromètre à transformée de Fourier BRUKER ARX 400 de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes (ENSCR). Les spectres RMN ^1H ont été obtenus à 400,13 MHz.
- Des expériences en HR-MAS avec un spectromètres RMN Avance 500 MHz (BRUKER) équipé d'une sonde HR-MAS triple résonance ont été réalisées au laboratoire « RMN structurale des protéines et des interactions lipides-protéines » de l'UMR CNRS 6026 (Université de Rennes 1).
- Des expériences CP-MAS et SPE-MAS avec un spectromètre RMN WB AMX 400 MHz équipé d'une sonde 4 mm à double résonance H/X, à la température de 294 K et avec une fréquence de rotation de 7kHz, ont été réalisées au Centre de Recherches de l'INRA de Nantes.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne.

Infrarouges (IR)

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectromètre à transformée de Fourier THERMO NICOLET AVATAR 320 (ENSCR). Les échantillons ont été examinés sous forme de pastille dans le KBr (2 mg de produit dans 200 mg de KBr). Les fréquences d'absorption sont exprimées en cm^{-1} .

Analyses élémentaires

- Les analyses élémentaires des éléments C, H, N et S ont été effectuées par le service de micro analyses du Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO, Université de Rennes 1).
- Les dosages des métaux (Cu, Zn et Mn) et du phosphore ont été réalisés au Service Central d'Analyses de Vernaison (CNRS).

Lyophilisation

Les solutions ont été lyophilisées avec un appareil CHRIST Alpha 1-2 (ENSCR)

Ultrasonication

- Les essais à l'échelle du laboratoire ont été réalisés sur un sonificateur VCX 600 basse fréquence de 20 khz commandé par un microprocesseur Vibra Cell 72412 (Bioblock Scientific) à l'ENSCR.
- Les essais à une échelle petit pilote ont été réalisés sur des installations « maison » au Laboratoire d'Electrochimie et de Physico-chimie des Matériaux et des Interfaces (UMR 5631 / CNRS - INPG - UJF / Equipe de Génie des Procédés, Saint Martin d'Hères).

Centrifugation

Les solutions ont été centrifugées à l'aide d'un appareil HETTICH ZENTRIFUGEN – UNIVERSAL 32 R (ENSCR).

Viscosimétrie

Les mesures de viscosité ont été réalisées sur un viscosimètre rotatif Viscotester GL/R HAAKE (ENSCR).

Ultrafiltration

Une cellule à agitation Amicon type 8200 munie de membranes frontales, d'acétate de cellulose, de seuils de coupures de 500 Da (YCO5) a permis l'ultrafiltration d'échantillons (ENSCR).

Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses CPG ont été réalisées à l'Ifremer (centre de Nantes) sur un chromatographe 5890 série II (Hewlett Packard) avec passeur automatique équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne apolaire en silice fondue CP-Sil5CB (Chrompack) et relié à un intégrateur HP 3365 (Hewlett Packard). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium.

Spectroscopie UV Visible

Les analyses UV Visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-VIS-NIR Varian de référence Cary 4000 (ENSCR).

Mesures de taille

Les mesures de taille des particules ont été réalisées sur un appareil Zétasizer 3000 HS de marque Malvern (ENSCR).

Purification des solvants

Les solvants ont été purifiés et séchés selon les procédures usuelles (D.D. Perrin, W.L.F. Armarego, Purification of Laboratory Chemicals 3^{ème} éd., Pergamon Press, Oxford, 1988).

Chromatographies sur silice

Les chromatographies analytiques sur couches minces (CCM) inverses ont été réalisées sur des plaques de gel de silice C₁₈ d'épaisseur 0,25 mm de référence RP-18W/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel).

Polarographie sur mercure

Les analyses par polarographie sur mercure ont été réalisées avec un polarographe Metrohm 626 avec mesure continue du courant (UMR CNRS 6509 « Organométalliques et catalyse, Chimie et Electrochimie Moléculaires » de Rennes).

Montage électrolytique

Afin de suivre la quantité de courant passant dans le système électrolytique, un intégrateur de type IG 5-N a été monté en série entre l'électrode de graphite (contre électrode) et le potentiostat (EG&G, 362) (UMR CNRS 6509 « Organométalliques et catalyse, Chimie et Electrochimie Moléculaires » de Rennes).

La description des appareillages utilisés pour la détermination des masses molaires par HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography) est traitée dans la partie expérimentale de la partie 1 de ce mémoire.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN acide désoxyribonucléique
BF basses fréquences
BSA albumine de sérum bovin
CCM chromatographie sur couche mince
CM catalyse métallique
CPG chromatographie en phase gazeuse
CPM coups par minute
CPMAS RMN du solide par polarisation croisée avec rotation à l'angle magique
Da dalton
DA degré d'acétylation
DCC dicyclohexylcarbodiimide
D dextrogyre
DMAP N,N 4-diméthylaminopyridine
DMEM milieu Eagle modifié par Dubelco
DMF N,N diméthylformamide
DMSO diméthylsulfoxyde
DO densité optique
DS degré de substitution
E potentiel électrochimique
ECS électrode au calomel saturé
EPS exopolysaccharide
éq équivalent
Fuc fucose
Gal galactose
GalA acide galacturonique
Glc glucose
GlcA acide glucuronique
Gul gulose
Gy gray
HF hautes fréquences
HPSEC chromatographie d'exclusion stérique haute pression
HR-MAS RMN de haute résolution à l'angle magique
i intensité du courant
I contraste
I_p indice de polydispersité
IR infrarouge
Lac lactate

L lévogyre
LPL lipoprotéine lipase
LPS lipopolysaccharide bactérien
M_n masse molaire moyenne en nombre
M_p masse molaire au pic
M_w masse molaire moyenne en masse
Man mannose
MeOH méthanol
Milieu PBMC cellules mononuclées du sang périphérique
m/m masse/masse
MTT Bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
m/v masse/volume
nd non déterminé(e)
ORD « oxidative reductive depolymerization »
p forme pyranose
PC phosphatidylcholine
ppm parties par million
Pyr Pyridine
Q quantité d'électricité
R masse totale de peroxyde d'hydrogène introduite/ masse initiale d'EPS
R_f rapport frontal
Rha rhamnose
RMN résonance magnétique nucléaire
RPM rotations par minute
SI indice de stimulation
SPE-MAS détection directe (« single pulse excitation ») à l'angle magique
SVF sérum de veau foetal
T température
t durée
TA température ambiante
Tampon Tris Tampon tris(hydroxyl)aminométhane
TBARS substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TEMPO 2,2,6,6-tétraméthylpipéridinoxy
TMS triméthylsilyl
UF ultrafiltration
US ultrasons
UV ultraviolet
V volume

SOMMAIRE

Introduction générale :

L'HYD 657: Un exopolysaccharide (EPS) bactérien d'origine hydrothermale

1- Les bactéries hydrothermales	1
1.1- Présentation des sources hydrothermales	1
1.2- Les bactéries des sources hydrothermales profondes	2
1.3- La souchothèque de l'Ifremer	3
2- La production d'exopolysaccharides (EPS)	3
2.1- Définition d'un exopolysaccharide	3
2.2- Biosynthèse des EPS	3
2.3- Rôle physiologique	4
2.4- Identification des bactéries productrices d'EPS	4
2.5- Industrialisation de la production	5
3- Caractéristiques des EPS	6
3.1- Classification	6
3.2- Modulations structurales naturelles	7
4- Intérêts et limites à l'utilisation d'EPS	8
4.1- Intérêts des EPS	8
4.2- Applications et perspectives	8
4.3- Limites au développement	9
5- L'EPS HYD 657 natif	10
5.1- Production et isolement de l'EPS HYD 657 natif	10
5.2- Caractéristiques de l'EPS HYD 657	11
5.3- Hypothèse de structure	11
5.4- Applications	11
5.5- Objectif du travail de thèse	12
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	13

PARTIE 1 :

Etude d'une voie physique de dépolymérisation : Les ultrasons

1- Les voies physiques de dépolymérisation	17
1.1- Irradiation gamma	17
1.2- Faisceau d'électrons	19
1.3- Irradiation UV	20
1.4- Microondes	21
2- La sonochimie en dépolymérisation	22
2.1- Quelle est l'origine physique de la sonochimie ?	22
2.2- Les ultrasons en dépolymérisation	23
2.3- Les ultrasons et l'industrie	24

3- Matériel et méthodes générales de caractérisation.....	26
3.1- Les EPS utilisés	26
3.2- La dépolymérisation par les ultrasons	27
3.3- Les plans d'expériences	29
3.4- Les techniques d'analyses.....	30
4- Résultats et discussions	33
4.1- Etudes préliminaires	33
4.2- Etude de la dépolymérisation de l'EPS HYD 657 par les ultrasons	41
4.3- Synergie peroxyde d'hydrogène et ultrasons pour l'EPS HYD 657	46
4.4- Recherche d'autres synergies	48
4.5- Manipulations préliminaires d'extension d'échelle	50
4.6- Premier changement d'échelle	53
5- Conclusions et perspectives.....	55
PARTIE EXPERIMENTALE.....	57
ANNEXE.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65

PARTIE 2 :
Etude de deux voies chimiques de dépolymérisation :
La catalyse métallique et l'électrochimie

1- Les voies chimiques de dépolymérisation	69
1.1- L'hydrolyse acide	69
1.2- Utilisation de l'acide nitreux	70
1.3- L'ozonolyse.....	71
1.4- Oxydation par le periodate.....	73
1.5- Autres molécules oxydantes.....	74
2- La dépolymérisation par catalyse métallique.....	74
2.1- La catalyse métallique	75
2.2- Les mécanismes radicalaires possibles	76
3- Matériel et méthodes générales de caractérisation.....	79
3.1- EPS utilisé.....	79
3.2- Montage utilisé en dépolymérisation par catalyse métallique	79
3.3- Les techniques d'analyses.....	80
4- Résultats et discussions	80
4.1- Mise au point de la dépolymérisation radicalaire sur l'EPS HYD 657	80
4.2- Etudes préliminaires	80
4.3- Mise en place des conditions.....	82
4.4- Importance du métal lors de la dépolymérisation	88
4.5- Premier transfert du protocole de dépolymérisation par catalyse métallique.....	98
5- Conclusions et perspectives.....	98
6- Etude prospective d'une nouvelle voie de dépolymérisation par électrochimie	99

6.1- La voie électrochimique en dépolymérisation dans la littérature.....	99
6.2- Matériel et méthodes générales de caractérisation.....	101
6.3- Résultats.....	102
6.4- Perspectives.....	106
PARTIE EXPERIMENTALE.....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	113

PARTIE 3 :

Evaluation de différentes activités biologiques de fractions dépolymérisées

1- Détermination de l'activité immunostimulante des fractions dépolymérisées.....	117
1.1- Matériels et méthodes.....	117
1.2- Résultats.....	118
1.3- Conclusion.....	121
2- Détermination de l'effet anti-radicalaire de fractions dépolymérisées.....	121
2.1- Matériels et méthodes.....	121
2.2- Résultats.....	122
2.3- Conclusion.....	124
3- Détermination de l'effet amincissant de fractions dépolymérisées.....	124
3.1- Matériels et méthodes.....	124
3.2- Résultats.....	125
3.3- Conclusion.....	128
4- Conclusions.....	129
PARTIE EXPERIMENTALE.....	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	135

PARTIE 4 :

Modulations structurales de l'HYD 657 natif ou partiellement dépolymérisé

1- Modifications chimiques des polysaccharides.....	137
2- Ajout de groupements chargés négativement sur l'EPS.....	138
2.1- Sulfatation.....	138
2.2- Phosphatation.....	149
3- Ajout de groupements chargés positivement.....	155
4- Augmentation de la lipophilie de l'ESP par estérification.....	159
4.1- Acétylation.....	160
4.2- Ajout de chaînes grasses.....	167
5- Variations structurales fortes : oxydation de l'EPS.....	174
6- Conclusions et perspectives.....	181
PARTIE EXPERIMENTALE.....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	181
CONCLUSION GENERALE.....	195

INTRODUCTION GENERALE

L'HYD 657: Un exopolysaccharide (EPS) bactérien d'origine hydrothermale

1- Les bactéries hydrothermales

1.1- Présentation des sources hydrothermales

L'hydrothermalisme profond est une manifestation géothermique spectaculaire localisée à l'axe des dorsales océaniques (Figure 1), lieu d'accrétion (déchirement de la croûte océanique accompagnée de remontée de magma) résultant du mouvement des plaques tectoniques. Au niveau du canal, ou *graben*, au centre de la dorsale océanique, l'eau de mer (2 à 3°C) s'infiltre dans le plancher basaltique fissuré et se rapproche de la chambre magmatique. Le gradient de température croissant, qui atteint 800 à 900°C, permet des réactions chimiques spécifiques. L'eau s'enrichit ainsi en divers composés, et rejaille sous la forme d'un fluide chaud (350°C), anoxique, acide (pH compris entre 2 et 5,9), riche en CO₂, en éléments réduits tels que H₂S (jusqu'à 4 mM), SiO₂, CH₄ (jusqu'à 50 nM), NH₄⁺, H⁺ et en éléments métalliques tels que Mn²⁺ (jusqu'à 1mM), Fe²⁺ (jusqu'à 200µM), Li⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ [1].

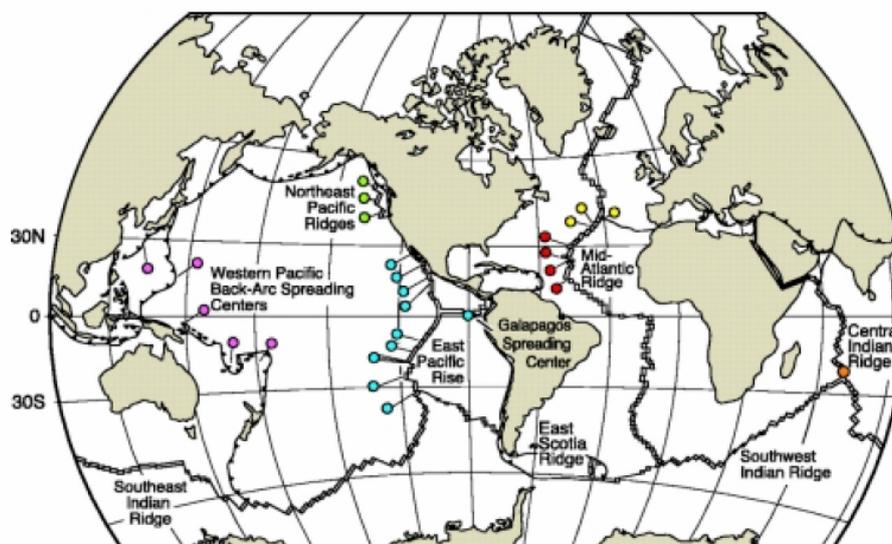


Figure 1: Carte des principales sources hydrothermales explorées [2]

Le fluide hydrothermal peut rejaller à l'interface eau/ croûte océanique sans dilution préalable et précipiter sous la forme de sulfures polymétalliques et de sulfates de calcium pour former les cheminées hydrothermales (150 à 400°C) (Figure 2), ou se mélanger en sub-surface dans des réseaux de fissures pour s'échapper lentement à des températures plus faibles (mélanges diffus, 5-50°C). C'est dans cet environnement où les gradients thermochimiques sont accentués, et la lumière est absente (la photosynthèse y est donc impossible) qu'ont été découvertes en 1977 vers 2500 m de profondeur des communautés animales présentant un taux d'endémisme élevé, de fortes biomasses et une faible diversité spécifique [3].

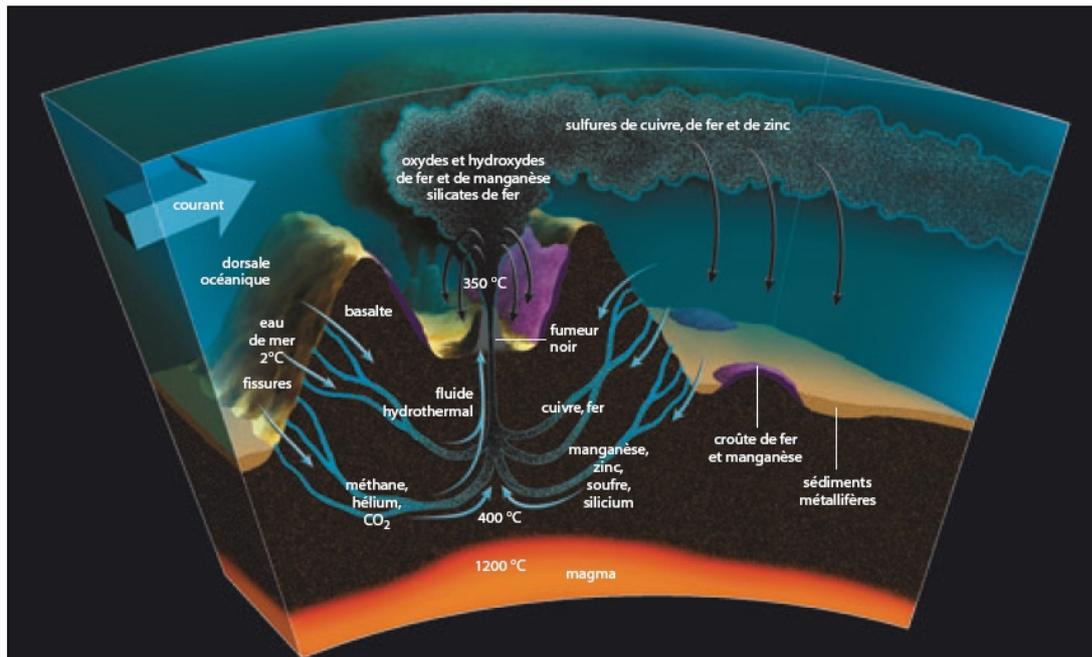


Figure 2: Formation du fluide hydrothermal [4]

1.2- Les bactéries des sources hydrothermales profondes

C'est au niveau des sources hydrothermales que, pour la première fois, un écosystème pratiquement indépendant de l'énergie solaire a été découvert. La production primaire y est assurée par des bactéries vivant souvent dans des mollusques, des vers, des crevettes, dans les sédiments à des teneurs de 10^5 à 10^6 par millilitre. Les bactéries sont chimiotrophes et tirent leur énergie de l'oxydation de composés minéraux. Les réactions de chimiosynthèse nécessitent à la fois un donneur d'électrons et un accepteur (ou puits) d'électrons. Les donneurs d'électrons inorganiques utilisés peuvent être le dihydrogène, divers composés soufrés (hydrogène sulfuré, thiosulfate, soufre), l'ammoniac, les nitrites, les ions ferreux ou le manganèse. Les accepteurs d'électrons peuvent être le dioxygène, les nitrates, les sulfates ou le dioxyde de carbone dans le cas de la méthanogénèse. Les bactéries réduisent le dioxyde de carbone en sucre. Le mécanisme biologique d'incorporation du CO₂ par le cycle de Calvin-Benson est ensuite semblable dans le monde vivant quels que soient les organismes autotrophes considérés :

- 1) Réaction de condensation d'un pentose avec le CO₂ pour former un acide organique ;
- 2) Réduction de l'acide organique en sucre ;
- 3) Régénération du pentose.

On distingue différentes familles de bactéries avec des exigences physico-chimiques propres, particulièrement en ce qui concerne la température. Certaines se développent à la température normale du fond des mers, soit environ 2°C, d'autres, les mésophiles, à des températures moyennes (10-30°C), résultat de l'émission des fluides hydrothermaux ; enfin certaines souches, dites hyperthermophiles, se développent aux alentours de 100°C, et le record actuel est détenu par des bactéries qui vivent à 110°C, une température à laquelle l'eau reste liquide en raison de la pression hydrostatique .

1.3- La souchothèque de l'Ifremer

A l'issue de différentes campagnes océanographiques, l'Ifremer s'est constitué une collection de bactéries provenant de ces environnements qualifiés d'extrêmes. La collection compte à ce jour environ 1300 isolats mais seulement 408 ont été identifiés. Cette collection est constituée de microorganismes mésophiles et de microorganismes thermophiles et hyperthermophiles avec pour certains d'entre eux des optima de croissance en température supérieurs à 100°C. Parmi les microorganismes identifiés à ce jour les bactéries mésophiles appartiennent principalement aux genres *Vibrio*, *Alteromonas* et *Pseudoalteromonas* [5,6,7,8,9] et les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont du genre *Pyrococcus*, *Thermococcus* et *Desulfurobacterium* [9,10,11,12]. Les études engagées sur cette collection aboutiront très probablement à la description de nouveaux genres et espèces bactériens.

2. La production d'exopolysaccharides (EPS)

2.1-Définition d'un exopolysaccharide

Les bactéries produisent souvent des polysaccharides de surface. Ces polysaccharides de surface sont soit des constituants de la paroi (peptidoglycanes, acides téichoïques, lipopolysaccharides...), soit excrétés (polysaccharides capsulaires enrobant la cellule ou « slime » et polysaccharides libérés dans le milieu de culture). Ces polysaccharides excrétés sont souvent appelés polysaccharides exocellulaires ou encore exopolysaccharides (EPS), terme proposé tout d'abord par Sutherland [13] puis repris par Cerning [14] comme appellation générale. Les polysaccharides exocellulaires ou EPS sont divisés en deux groupes : les homopolysaccharides constitués d'un seul type de monosaccharide (dextranes, glucanes, ...) et les hétéropolysaccharides constitués de monosaccharides différents (xanthane, gellane...).

2.2-Biosynthèse des EPS

La biosynthèse des hétéropolysaccharides est plus complexe que celle des homopolysaccharides. Dans le cas des homopolysaccharides, la synthèse se déroule grâce à des enzymes sécrétées soit à l'extérieur de la cellule, soit au niveau de la membrane. Par exemple les dextranes, composés exclusivement de glucoses, sont synthétisés par des bactéries (*Streptococcus* et *Leuconostoc*), la biosynthèse fait intervenir une seule enzyme, la dextrane sucrase qui est une D-glycosyl-transférase et qui va transférer le D-glucose du saccharose (substrat spécifique de la synthèse) sur un accepteur. En ce qui concerne les hétéropolysaccharides, les voies de biosynthèse sont plus complexes. La première étape se situe dans le cytoplasme grâce à différentes glycosyltransférases très spécifiques qui vont permettre la formation d'une séquence répétitive. Les séquences (ou motifs) vont être ensuite exportées, polymérisées et libérées dans le milieu [15].

Différents facteurs peuvent affecter la production des EPS par les bactéries tels que la concentration en cations divalents, le ratio carbone-azote et la disponibilité en certains substrats.

2.3-Rôle physiologique

Le rôle biologique de ces polysaccharides n'est pas bien élucidé. Il a été proposé que la capacité de production d'EPS constitue une réponse directe et logique aux pressions sélectives de l'environnement [16]. En effet, la production d'EPS demande beaucoup d'énergie et il paraît donc improbable qu'une bactérie utilise autant d'énergie et de substrat sans en tirer un avantage. Sous des conditions naturelles, et donc fortement concurrentielles, les EPS semblent donner aux bactéries un avantage compétitif et leur permettre de survivre [14]. Des études montrent ainsi que les polysaccharides sont impliqués dans l'adhésion des bactéries sur les surfaces : ils composent les biofilms qui entourent la colonie [17,18,19]. L'adhésion et le biofilm permettent aux bactéries de se développer et de capturer leurs nutriments. Les EPS interagissent avec les ions pouvant ainsi participer au transport de solutés chez les microorganismes [20]. Ils représentent donc une zone d'adsorption et d'échange, ils peuvent jouer le rôle de tampon ou de protection vis-à-vis de l'environnement. Le biofilm permet ainsi de protéger la bactérie des tensioactifs ou surfactifs et même des antibiotiques [21]. La capacité à s'enrober dans une couche d'EPS avec une forte teneur en eau rend également la cellule plus résistante à la dessiccation. Une autre fonction des EPS pourrait être de protéger les cellules contre la phagocytose, les données à ce sujet dans la littérature sont contradictoires.

2.4-Identification des bactéries productrices d'EPS

L'identification de bactéries productrices d'exopolysaccharides passe par une phase de criblage. Parmi les isolats constituant la souchothèque Ifremer, un premier criblage a permis d'identifier les souches productrices d'EPS à pression atmosphérique et à température ambiante [5,22,23,24]. Ces souches ont été sélectionnées sur la base de quatre tests de criblages différents : expression d'un phénotype mucoïde (Figure 3), mesure de la viscosité lors de cultures en milieux liquides, fixation et coloration spécifique des exopolysaccharides, coloration négative à l'encre de Chine. Les expériences ont permis de sélectionner 50 souches capables de produire des exopolysaccharides dans ces conditions de culture.

A ce jour, près de 10 polymères présentant des caractéristiques physico-chimiques et/ou rhéologiques innovantes ont été décrits.



Figure 3: Culture en boîte de Pétri de souches mucoïdes

2.5-Industrialisation de la production

Pour la production d'EPS, les bactéries peuvent être cultivées en milieu liquide dans des fermenteurs de différentes capacités de 1 à 100 litres (Figure 4). La quantité d'exopolysaccharides produits peut varier, ainsi selon la bactérie et les conditions de culture, entre 0,5 et 5 grammes d'EPS par litre de culture peuvent être obtenus. Il est donc nécessaire à ce stade d'optimiser les conditions de fermentation comme le pH, la température, l'agitation, mais aussi la composition du milieu de culture (source d'azote, de carbone...). Les conditions physico-chimiques de biosynthèse sont celles du laboratoire et le milieu choisi est un milieu marin reconstitué enrichi par une source de carbone (très souvent du glucose). Un meilleur rendement est souvent obtenu lorsque le développement des cellules est limité par un autre élément nutritif comme l'azote, le soufre, le magnésium, le potassium ou le phosphore [25]. Il faut alors de 48 à 60 heures pour observer un changement notable de ce milieu de culture notamment une forte augmentation de viscosité traduisant l'apparition d'exopolysaccharides. Les méthodes utilisées pour récupérer le polysaccharide à partir du moût de culture vont dépendre de la pureté requise, du rendement de la fermentation et de la proportion de biomasse insoluble (débris cellulaires par exemple). Afin d'obtenir des solutions limpides et plus pures il convient de clarifier le moût de culture avant la récupération du polysaccharide. Une centrifugation à haute vitesse (20 000 g) permet d'isoler les cellules bactériennes et des traitements ultérieurs, en utilisant soit des alcools froids ou de l'acétone, soit des ultracentrifugations et dialyses successives, permettent d'obtenir, dans la grande majorité des cas, un ou parfois deux, exopolymère(s) à très faible taux de contaminants [24,26].

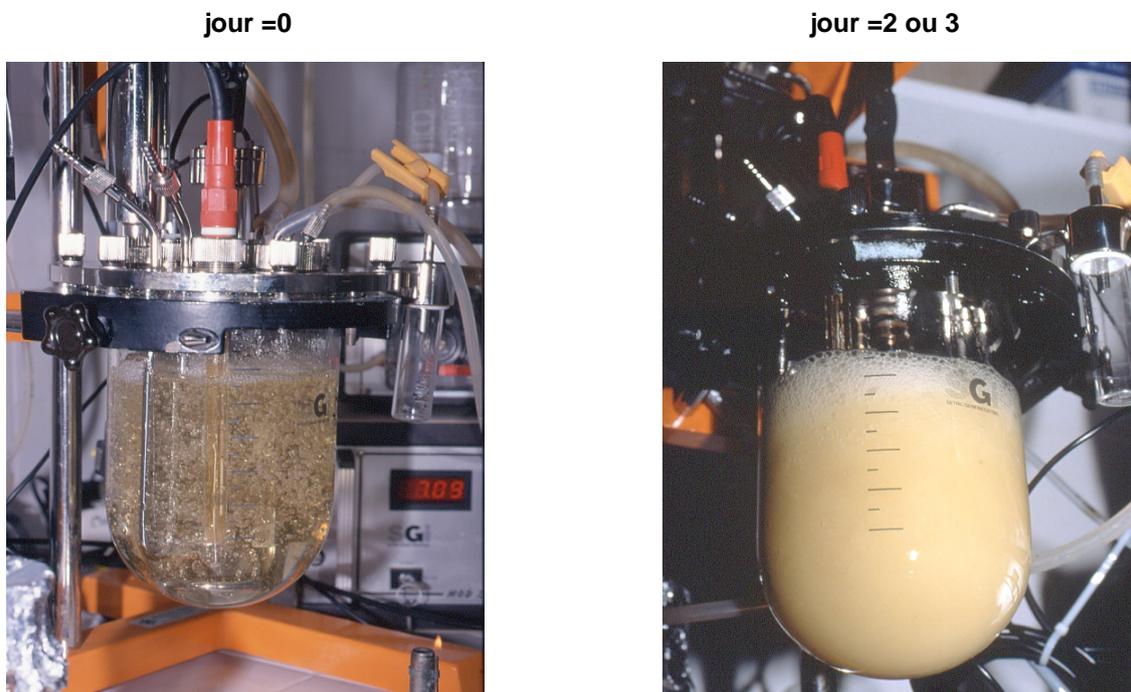


Figure 4 : Production d'EPS dans un fermenteur de 2 litres

3. Caractéristiques des EPS

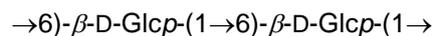
3.1-Classification

Un grand nombre d'EPS bactériens, dont certains possèdent une importance industrielle, sont des homopolysaccharides. Bien que la chaîne du polymère se compose d'un seul type de sucre, les propriétés des homopolysaccharides peuvent varier énormément : l'enchaînement de leurs résidus et la présence de ramifications modifient leurs comportements en solution. Les homopolysaccharides sont caractérisés par un poids moléculaire souvent très élevé. Ainsi le poids moléculaire du dextrane produit par *Leuconostoc mesenteroides* varie entre 6,2 et 7,1.10⁶ Da.

Parmi les homopolysaccharides les plus étudiés :

- Les curdlanes (Figure 5a) sécrétés par *Agrobacterium radiobacter* [27] sont des polyglucanes β (1,3) formant un gel en solution.
- Les dextrans (Figure 5b) produits par *Leuconostoc mesenteroides* [13] sont des polyglucanes β (1,4) formant un gel en solution.
- La cellulose synthétisée par *Acetobacter xylinum* [28] est également un polyglucane β (1,4) mais celui-ci est insoluble en solution.

(a)



(b)

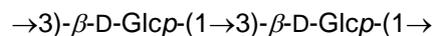


Figure 5 : (a) Structure primaire de l'unité de répétition du dextrane produit par *Leuconostoc mesenteroides* (b) Structure primaire de l'unité de répétition du curdlane sécrété par *Agrobacterium radiobacter*

Les hétéropolysaccharides représentent la très grande majorité des polysaccharides bactériens. Ils forment un vaste groupe et sont composés d'unités répétitives de 2 à 10 sucres de complexité variable. Ils peuvent être ramifiés ou linéaires. Les monosaccharides les plus fréquemment rencontrés sont le glucose, le galactose et le rhamnose pour les oses neutres, l'acide glucuronique et l'acide galacturonique pour les oses acides.

Parmi les hétéropolysaccharides les plus utilisés:

- le xanthane (Figure 6a) sécrété par *Xanthomonas campestris* [29]. Il s'agit d'un polymère dont la chaîne principale est constituée de D-glucoses et dont les liaisons sont en β(1-4). Un maillon glucose sur deux est substitué en position 3 par une chaîne latérale trisaccharidique comportant un résidu acide glucuronique, et deux résidus mannose, l'un sous forme d'acétate, l'autre sous forme pyruvate. Il résulte de cette structure qu'il s'agit d'une molécule anionique, caractère primordial pour comprendre son comportement, son affinité et ses interactions. Les solutions aqueuses de xanthane ont un fort pouvoir viscosifiant et viscoélastique. Il est utilisé pour moitié dans l'industrie agroalimentaire.
- Le gellane (Figure 6b) est produit par *Pseudomonas elodea* [30]. Son unité de répétition est constituée d'un tétrasaccharide linéaire anionique comportant du L-Rhamnose, du D-glucose et de

plus, les acides uroniques et les pyruvates présents dans de nombreux polysaccharides vont, quant à eux, permettre la fixation de cations. D'autres substituants (succinyle, proprionyle, glycéryle...) formant des liaisons esters vont accroître la lipophilie des polysaccharides.

Les substituants inorganiques sont rarement rencontrés contrairement aux polysaccharides d'origine algale ou animale. Certaines bactéries comme l'*Alteromonas Infernus* [36] sont capables de produire des EPS possédant un groupement sulfate dans l'unité répétitive mais les taux de sulfates sont bas (<10% du poids de la molécule) comparés à l'héparine qui peut contenir jusqu'à 40% de sulfates. Les groupements phosphorylés qui se présentent sous forme de mono- ou de di- esters sont plus répandus et font, par exemple, partie de la composition d'EPS synthétisés par des bactéries d'acide lactique [37].

4. Intérêts et limites à l'utilisation d'EPS

4.1-Intérêts des EPS

En terme d'exploitation biotechnologique, les exopolysaccharides bactériens présentent des intérêts par rapport à ceux issus de plantes ou d'algues :

- La biosynthèse en fermenteur assure l'absence de dépendance vis à vis d'aléas climatiques, écologiques et politiques pouvant affecter la qualité, le coût et l'approvisionnement ;
- Les possibilités d'agir sur les conditions de fermentation (sources de carbone, température, aération, pH, etc...) en vue d'optimiser la production, d'assurer la traçabilité, mais aussi de modifier le polymère produit;
- Ces polymères présentent une structure chimique régulière qui, dans de nombreux cas, conduit à la formation d'une conformation hélicoïdale qui rigidifie la chaîne ;
- Ils peuvent être extraits et purifiés sans utilisation de conditions drastiques ;
- les EPS possèdent une diversité de structure chimique qui peut conduire à des propriétés intéressantes pour des applications spécifiques en milieux aqueux.

4.2-Applications et perspectives

La diversité de structures des polysaccharides bactériens offre un large spectre de propriétés fonctionnelles. Les propriétés rhéologiques des polysaccharides bactériens en milieux aqueux vont en particulier leur permettre de trouver des applications dans des domaines variés tels que l'agriculture, les peintures, teintures, cosmétiques, explosifs, mines, produits phytosanitaires. Le tableau 1 [38] présente des applications établies des polysaccharides bactériens les plus connus.

Les scientifiques et les industriels s'intéressent de plus en plus aux activités biologiques de ces molécules et à leurs applications dans le domaine thérapeutique. Sur ce point, la littérature scientifique s'enrichit régulièrement de données relatives aux activités biologiques de ces polysaccharides et leurs applications potentielles dans différents secteurs de la santé. Ainsi, l'EPS de haut poids moléculaire produit par la souche *Vibrio diabolicus* qui présente une forte analogie avec l'acide hyaluronique a été utilisé avec succès comme implant de comblement osseux dans un modèle expérimental animal [39]. Un autre EPS produit par la bactérie *Alteromonas infernus* et modifié par

Introduction générale

dépolymérisation et sulfatation a montré des propriétés anticoagulantes que son équivalent natif ne possédait pas [40] et plus récemment des propriétés pro-angiogène [41]. De même la cellulose bactérienne produite par *Acetobacter xylinum* possède une forte capacité d'absorption d'eau et peut être exploitée en chirurgie comme peau artificielle provisoire pour diminuer les pertes d'eau ou pour empêcher la déshydratation des tissus. Appliquée humide, elle semble, après brûlure, activer la croissance des cellules de la peau humaine. La cellulose bactérienne utilisée comme substitut de la peau a été brevetée et est commercialisée sous le nom de BioFill [42]. Enfin, citons deux autres utilisations médicales des polysaccharides bactériens : les dextrans employés comme substituts de plasma [43] et le transport de principes actifs par des EPS de la famille des gellanes [44].

La mise en œuvre de nouvelles techniques de modifications de ces polymères ouvre donc des perspectives de nouvelles molécules bioactives pouvant avoir un extraordinaire potentiel applicatif.

	Utilisation	Polymère
Propriétés biologiques	Agents antitumoraux Chirurgie des yeux et des articulations Analogues d'Héparine Pansements	β -D-Glucanes Acide hyaluronique (<i>Streptococcus</i> EPS) <i>Escherichia coli</i> K5 EPS Cellulose bactérienne
Propriétés physiques		
Stabilisation d'émulsions	Alimentation, peintures thixotropiques	Xanthane
Solidité de la fibre	Membranes acoustiques	Cellulose bactérienne
Formation de film	Enrobage en alimentation	Pullulane
Floculant	Clarification de l'eau, extraction de minerai de cuivre	Variés
Stabilisation de mousse	Bière, extincteurs	Xanthane
Agents gélifiants	Technologies des cellules et des enzymes	Gellane
	Alimentation	Curdane et gellane
	Récupération du pétrole	Curdane et Xanthane
Agent hydratant	Cosmétiques, pharmaceutiques	Acide hyaluronique
Inhibiteur de la formation de cristaux	Nourriture congelée, pastilles et sirops	Xanthane
Contrôle de la viscosité et de la force de cisaillement	Forage pétrolier	Xanthane
Agent de suspension	Alimentation	Xanthane
	Enrobage en papeterie	Variés
	Pesticides dans l'agrochimie et vaporisateurs	Xanthane
Contrôle de la viscosité	Imprimantes	Xanthane
Agent de relargage	Médicaments, herbicides	Gellane

Tableau 1 : Applications des polysaccharides bactériens [38].

4.3-Limites au développement

Les inconvénients de ces polymères bactériens restent liés aux microorganismes eux-mêmes, à leur manipulation et conservation ainsi qu'à la production de métabolites secondaires associés à la fermentation. Selon les applications visées, la présence de traces d'ADN, d'ARN, de lipopolysaccharides ou autres produits secondaires biosynthétisés de manière concomitante à la production de polysaccharides, peut s'avérer rédhibitoire quant au devenir industriel de ces macromolécules.

Leur prix de revient limite souvent leur développement. Par exemple, dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, il sera difficile pour de nouveaux polysaccharides bactériens de supplanter le xanthane et gellane. Pour s'imposer dans ce domaine, les nouveaux EPS devront être plus performants ou présenter des propriétés nouvelles.

La grande majorité des exopolysaccharides identifiés à ce jour sont complexes et de très haut poids moléculaire (supérieur à un million de daltons). Ces hautes masses sont compatibles avec d'éventuelles applications dans les domaines de l'environnement, de la chimie et pour partie dans la cosmétique et dermocosmétique, mais le sont moins dans le cas d'applications dans un certain nombre de domaines de la santé et d'une utilisation en tant que produit bioactif. Une réduction de ces hautes masses s'impose et le processus de dépolymérisation (chimique, physique, enzymatique) doit alors être adapté à la nature du polysaccharide considéré.

5. L'EPS HYD 657 natif

Au cours de cette étude nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un exopolysaccharide produit par une bactérie hydrothermale : l'EPS HYD 657. L'EPS HYD 657 est issu d'une sous-espèce d'*Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* biovar *deepsane* [45]. Cette souche a été collectée pendant la campagne Hydronaut (HYD) en 1987 par le Nautille, à 13°N sur la dorsale Est Pacifique, à 2600 m de profondeur. Elle a été prélevée sur un annélide polychète : *Alvinella pompejana* [46].

5.1-Production et isolement de l'EPS HYD 657 natif

A l'échelle du laboratoire, la production de l'EPS HYD 657 est réalisée à 28°C dans un fermenteur de 2 litres dans un milieu marin synthétique supplémenté en glucose. Le fermenteur est inoculé par 100 ml d'une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance. Le pH est régulé à 7,2 par addition de soude (0,25 mol.L⁻¹) au moyen d'une pompe péristaltique. Le milieu est aéré à 30l.h⁻¹ d'air sous agitation (200 à 1100 tr/min) pendant toute la durée de la culture. La croissance bactérienne est suivie en mesurant la densité optique à 520 nm du milieu de culture. La viscosité est également contrôlée tout au long de la culture par un viscosimètre.

L'EPS est isolé du milieu de culture après 52h. Les cellules bactériennes sont éliminées par centrifugation et le polysaccharide contenu dans le surnageant est précipité par ajout d'éthanol absolu. Le précipité est ensuite lavé avec des mélanges successifs eau/éthanol. Le polysaccharide obtenu est ensuite lyophilisé [22].

5.2- Caractéristiques de l'EPS HYD 657

La composition globale de l'EPS HYD 657 natif a été déterminée grâce aux méthodes de dosage colorimétrique présentées dans la suite du rapport. Cette première approche a permis de montrer que cet EPS était composé de 40 à 50% d'oses neutres, de 30 à 40 % d'acides uroniques et de 0 à 5% de protéines.

La composition osidique réalisée en chromatographie gazeuse (protocole décrit par la suite) révèle que l'EPS est constitué de D-glucose, de D-galactose, de L-rhamnose, de L-fucose et de D-mannose mais également d'acide D-glucuronique et D-galacturonique (tableau 2). Ce polysaccharide a une masse molaire très élevée ($>10^6$ g/mol) et est assez polydispersé.

EPS	Rha	Fuc	GlcA	GalA	Gal	Glc	Man
Natif	3,4	1,8	6,1	7,3	21,7	12,3	1,8

Tableau 2 : Composition chimique de l'EPS HYD 657

5.3- Hypothèse de structure

L'hypothèse la plus probable concernant l'EPS (travaux non publiés d'Hélène Rougeaux, 1999) le décrit comme un undécasaccharide possédant 3 ramifications dont une possédant un acide glucuronique substitué en position 3 par un groupement lactate (Figure 7).

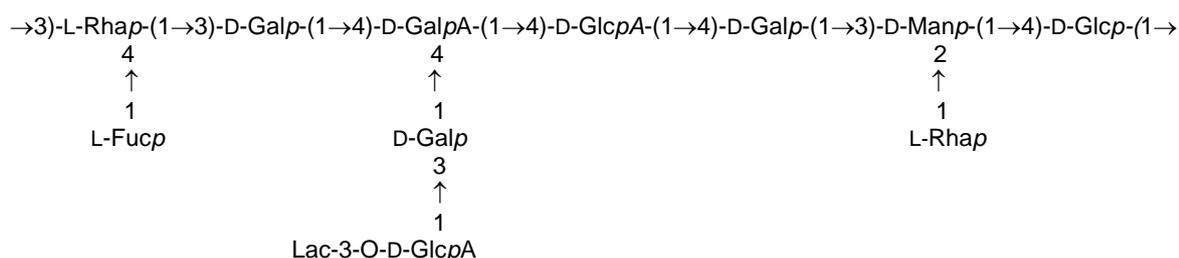


Figure 7: Hypothèse de structure de l'unité de répétition de l'EPS HYD 657

5.4- Applications

L'HYD 657, commercialisé sous le nom « Deepsane », est utilisé dans l'industrie cosmétique après criblage de ses activités biologiques par Lanatech [47]. Les recherches effectuées ont mis en évidence un effet stimulant de ces polysaccharides sur l'expression de l'interleukine-1 α , par les kératinocytes. Les kératinocytes représentent la majorité des cellules de l'épiderme et participent au rôle de « barrière » de la peau. L'interleukine-1 α est le tout premier médiateur de communication cellulaire synthétisé et excrété par les kératinocytes, médiateur capable d'initier la « cascade immunitaire ». Des recherches ont également été réalisées sur les effets protecteurs de solutions d'EPS vis-à-vis de cellules de Langerhans, acteurs importants du système de défense immunitaire cutané, sensibles aux agressions ultraviolettes. Ainsi, les différents tests réalisés ont montré une activité biologique importante de l'EPS préconisant son emploi en cosmétique notamment pour ses propriétés apaisantes en application topique cutanée.

5.5-Objectif du travail de thèse

Si l'EPS HYD 657 à l'état natif a d'ores et déjà trouvé des applications dans le domaine de la cosmétique et de la protection de la peau en particulier, une diminution de la masse molaire de l'EPS qui serait associée à une diminution de viscosité des solutions aqueuses, pourrait cependant élargir considérablement son champ d'application. Dans le cadre d'un contrat de recherche avec la société Lanatech filiale d'Atrium Biotechnologies, la modification de cet EPS a été envisagée en utilisant des méthodes physiques et chimiques.

Les deux premières parties de ce mémoire sont consacrées à la **dépolymérisation** de l'EPS HYD 657. Après une analyse de la bibliographie concernant les différentes voies de dépolymérisation, deux voies de dépolymérisation ont été retenues:

- une méthode chimique, la dépolymérisation par catalyse métallique, déjà utilisée et décrite par l'Ifremer sur d'autres EPS et les fucanes [48];
- une voie physique, la dépolymérisation par irradiation ultrasonique, qui avait déjà fait l'objet d'une étude prospective à l'ENSCR.

La démarche a été d'optimiser ces méthodes sur l'EPS HYD 657, polysaccharide qui par sa composition, sa structure et son poids moléculaire est très différent des polysaccharides étudiés dans les travaux déjà décrits. Pour cela, les facteurs influents sur l'efficacité et la reproductibilité de la dépolymérisation devaient être déterminés. Ce projet de thèse a été réalisé en collaboration avec un industriel et devait donc répondre à un cahier des charges précis. Les nombreuses études réalisées ont également permis de mieux appréhender la complexité des réactions mises en jeu lors de la dépolymérisation de l'EPS.

L'obtention d'échantillons présentant des masses mais également des compositions chimiques variées voire des structures différentes a permis la réalisation de premiers **criblages d'activités biologiques** qui sont présentés dans **la troisième partie** du mémoire.

Enfin, dans **la quatrième partie** du mémoire, la **faisabilité de modifications chimiques** de l'EPS natif ou partiellement dépolymérisé par introduction de groupements ou substituants, déjà décrits dans la littérature pour leur rôle essentiel dans l'activité biologique de dérivés polysaccharidiques, a été étudiée. Le but étant de générer, à terme, des activités biologiques spécifiques, liées ou non aux modifications des propriétés physicochimiques des dérivés d'EPS obtenus. Les modifications décrites ont été, dans le cadre de cette thèse, appliquées à l'EPS HYD 657 natif et/ou partiellement dépolymérisé mais peuvent être potentiellement généralisables à d'autres EPS. Les résultats de caractérisation et de quantification des modifications par des techniques d'analyses adaptées à chaque manipulation sont présentés.

- 1- Edmond J.M., Von Damm K.L. and Mc Duff R.E. (1982). Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal. *Nature*, 297(5863), 187-191.
- 2- Van Dover C.L., German C.R., Speer K.G., Parson and L.M., Vrijenhoek R.C. (2002). Review: Marine biology: Evolution and biogeography of deep-sea vent and seep invertebrates. *Science*, 295(5558), 1253-1257.
- 3- Corliss J., Ballard R.D. (1977). Oasis of life in the cold abyss. *National Geographic*, 152, 441-454.
- 4- Zal F. (2002). Les sources abyssales, berceau de la vie? *La Recherche*, 355, 22-25.
- 5- Raguénès G.R, Pignet P., Gauthier G., Peres A., Christen R., Rougeaux H., Barbier G. and Guézennec J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. fijiensis, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 67-73.
- 6- Raguénès G., Peres A., Ruimy R., Pignet P., Christen R., Loaec M., Rougeaux H., Barbier G. and Guezennec J. (1997a). *Alteromonas infernus* sp.nov, a new polysaccharide producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Bacteriology*, 82, 422-430.
- 7- Raguénès G., Christen R., Guezennec J., Pignet P. and Barbier G. (1997b). *Vibrio diabolicus* sp.nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 989-995.
- 8- Raguènes G., Cambon-Bonavita, M.A., Lohier, J. F., Boisset, C. ; Guezennec, J (2003). A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *Alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Current Microbiology*, 46(6), 448-452.
- 9- Cambon-Bonavita M.A, Lesongeur F., Pignet P., Wery N., Lambert C., Godfroy A., Querellou J. and Barbier G. (2003). *Thermococcus atlanticus* sp nov. A hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the Mid-Atlantic Ridge. *Extremophiles*, 7(4), 339- 344.
- 10- Godfroy A., Lesongeur F., Raguènes G., Querellou J., Antoine E., Meunier J.R., Guézennec J. and Barbier G. (1997). *Thermococcus hydrothermalis* sp.nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic bacteriology*, 47(3), 622-626.
- 11- Godfroy A., Meunier J.R, Guézennec J., Lesongeur F., Raguènes G., Rimbault A. and Barbier G. (1999). *Thermococcus fumicolans* sp.nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the North Fiji basin. *International journal of systematic bacteriology*, 49(4), 1951-1960.
- 12- Alain K., Rolland S., Crassous P., Lesongeur F, Zbinden M., LeGall C., Godfroy A., Page A., Juniper K., Cambon-Bonavita M., Duchiron F. and Querellou J. (2003). *Desulfurobacterium crunifex* sp nov., a novel thermophilic, pinkish-streamer forming, chemolithoautotrophic bacterium isolated from a Juan de Fuca hydrothermal vent and amendment of the genus *Desulfurobacterium*. *Extremophiles*, 7(5), 361-370.
- 13- Sutherland I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 8, 143-213.
- 14- Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M., Topisirovic L. (1994) Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied in Environmental Microbiology*, 60, 3914-3919.
- 15- Jolly L., Vincent S.J.F., Duboc P., Neeser J.R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 367-374.

- 16- Dudman W.F. (1977). *The role of surface polysaccharides in natural environments*. Academic Press, New York, USA.
- 17- Characklis W.G., McFeters G.A., Marshall K.C.(1989). *Biofilms*. Characklis W.G., Marshall K.C. (eds.), Wiley-Interscience Publication, 195 et 341.
- 18- Wolfaardt G.M., Lawrence J.R. and Korber D.R. (1999). Function of EPS. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Wingender J, Neu T, R., Flemming HC (eds), Springer-Verlag, New York, 17.
- 19- Flemming H.C. and Wingender J (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43, 1-8.
- 20- Geesey, G.G. (1982). Microbial exopolymers : ecological and economic considerations. *American Society for Microbiology news*, 48(1), 9-14.
- 21- O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49-79.
- 22- Talmont F., Vincent P., Fontaine T., Guezennec J, Prieur D. and Fournet B. (1991). Structural investigation of and acidic exopolysaccharide from deep-sea hydrothermal vent marine bacteria. *Food Hydrocolloids*, 5, 171-172.
- 23- Lijour Y., Gentric E., Deslandes E., Guezennec J. (1994) Estimation of the sulfate content of hydrothermal vent bacterial polysaccharides by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 220(2), 244-248.
- 24- Vincent P., Pignet P., Talmont F., Bozzi L., Fournet B., Guezennec J., Jeanthon C., Prieur D. (1994) Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 4134-4141.
- 25- Sutherland I. W. (1982). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides . *Advances in microbial physiology*, 23, 79-150.
- 26- Guezennec J., Pignet P, Raguenes G., Deslandes E., Lijour Y., Gentric E. (1994). Preliminary chemical characterization of unusual eubacterial exopolysaccharides of deep-sea origin. *Carbohydrate Polymers*, 24(4), 287-94.
- 27- Phillips K., Railton, Lawford H. G. (1983). Curdlan: its properties and production in batch and continuous fermentations. *Progress in Industrial Microbiology*, 18, 201-229.
- 28- Lin L.C., Brown R.M.Jr., Cooper J.B., Delmer D.P. (1985). Synthesis of fibrils in vitro by a solubilized cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*. *Science*, 230(4727), 822-825.
- 29- Morris V.J. (1995). *Food polysaccharides and their applications*, Stephen A.M. (ed.), Marcel Dekker, New York.
- 30- O'Neill M.A., Selvendran R.R. and Morris V.J. (1983). Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, 124, 123-133.
- 31- Michael A., Tombs P., Harding S.E. (1998). *An Introduction to Polysaccharide Biotechnology*, Taylor & Francis (ed.), London.
- 32- Manzoni M., Bergomi S., Cavazzoni V. (1993). Extracellular K5 polysaccharide of *Escherichia coli* : production and purification. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 8(3), 251-257.

- 33- Rodriguez M.L., Jann B., Jann K. (1988). Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose containing polysaccharide with a chondroitin backbone. *European Journal of Biochemistry*, 177(1), 117-124.
- 34- Rinaudo M. (2004). Role of Substituents on the Properties of Some Polysaccharides. *Biomacromolecules*, 5(4), 1155-1165.
- 35- Goycoolea F.M., Milas M. and Rinaudo M. (2001) Associative phenomena in galactomannan-deacetylated xanthan systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29(3), 181-192.
- 36- Roger O., Kervarec N., Ratiskol J., Collic-Jouault S. and Chevolut L. (2004). Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Research*, 339(14), 2371-2380.
- 37- De Vuyst L., Degeest B. (1999b). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153-177.
- 38- Sutherland I. W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16(1), 41-46.
- 39- Zanchetta P., Lagarde N. and Guezennec J. (2003). A new bone-healing material : a hyaluronic Acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcified Tissue International*, 72, 74-79.
- 40- Collic-Jouault S., Chevolut L., Helley D., Ratiskol J., Bros A., Siquin C., et al (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas Infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528, 141-151.
- 41- Matou S., Collic-Jouault S., Galy-Fauroux I., Ratiskol J., Siquin C., Guezennec J., Fischer A.M., Helley D. (2005). Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth-2 or vascular endothelial growth factor *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 69(5), 751-759.
- 42- Jonas R., Farah L.F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 101-106.
- 43- Carlin G., Wik K.O., Arfors K.E., Saldeen T. and Tangen O. (1976). Influences on the formation and structure of fibrin. *Thrombosis Research*, 9(6), 623-36.
- 44- Carlfors J., Edsman K., Petersson R. and Jorving, K. (1998). Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 113-119.
- 45- Cambon-Bonavita M.A., Raguénès G., Jean J., Vincent P., Guezennec J. (2002). A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Journal of applied microbiology*, 93, 310-315.
- 46- Desbruyères D. and Laubier L. (1980). *Alvinella pompejana* gen. sp. nov., *Ampharatiidae* aberrant des sources hydrothermales de la ride Est-Pacifique. *Oceanologica Acta*, 3, 267-274.
- 47- Frisch M.C., Vacher A.M. (2000). Composition cosmétiques contenant au moins un polysaccharide provenant de bactéries d'origine hydrothermale. Brevet EP0987010. 2000-03-22.
- 48- Nardella A., Chaubet F., Boisson-Vidal C., Blondin C., Durand P., Jozefonvicz J. (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate research*, 289, 201-8.

PARTIE 1 : Etude d'une voie physique de dépolymérisation : les ultrasons

1- Les voies physiques de dépolymérisation

Les méthodes de dépolymérisation physique n'ont pour l'instant pas fait l'objet de beaucoup d'études comparées aux voies de dépolymérisation chimique. Pourtant ces méthodes simples et efficaces permettent d'éviter l'utilisation de produits chimiques et paraissent facilement transposables à grande échelle.

1.1- Irradiation gamma

Pour ce type de dépolymérisation des sources $^{60}\text{Co}-\gamma$ sont utilisées. L'irradiation du polysaccharide peut se faire lorsque celui-ci est à l'état solide, liquide ou sous forme de gels. Les doses nécessaires pour dépolymériser un polysaccharide sont beaucoup moins importantes lorsque celui-ci est sous forme de gel qu'à l'état solide [1]. A titre d'exemple, la figure 1 présente les résultats obtenus lors de la dépolymérisation de κ -carraghénane. La dose est définie par la quantité d'énergie absorbée par la cible et se mesure en gray ou mega rads.

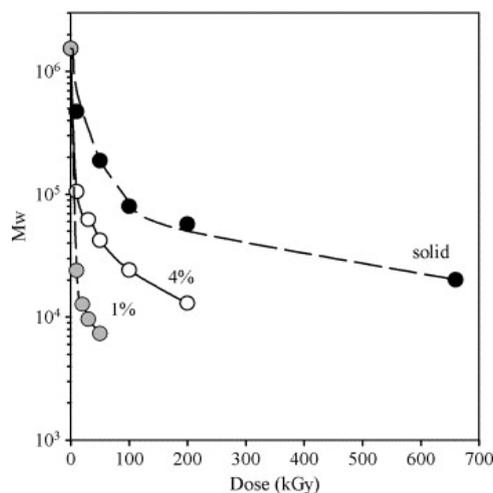
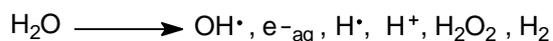


Figure 1 : Masse molaire du κ - carraghénane pour différentes doses d'irradiation à l'état solide et pour des gels à 1 et 4% en masse [1].

Une dépolymérisation plus efficace quand le polymère est sous forme de gels peut être expliquée par le fait que les radiations ionisantes auxquelles le polymère est soumis voient leurs énergies pratiquement uniquement absorbées par l'eau : lors de la radiolyse de l'eau des radicaux hydroxyles, des électrons hydratés et des radicaux H^{\bullet} sont en effet formés [2] :



Les électrons hydratés sont les initiateurs de la chaîne de réactions chimiques induites par les rayonnements ionisants. Comme leur nom l'indique, ces électrons hydratés sont des électrons dissous dans l'eau qui occupent une cavité elliptique formée par 6 molécules d'eau. Par rapport à un électron libre, qui n'est pas lié à des molécules de solvant, l'électron hydraté est stabilisé pendant quelques

microsecondes par sa cage de molécules d'eau ce qui facilite le transfert d'électrons et ainsi de nombreuses réactions. Leurs mécanismes d'action ne sont pas encore bien élucidés et font toujours l'objet de nombreuses recherches [3].

Les réactions du radical H[•] avec de nombreux carbohydrates sont plus lentes que celles faisant intervenir les radicaux hydroxyles la plupart du temps.

La sensibilité d'un polymère aux irradiations gamma peut facilement être évaluée à partir du coefficient de dépolymérisation G_d déterminé par l'équation de Charlesby-Pinner [4] :

$M_n^{-1} - M_0^{-1} = G_d \times 1,04 \times 10^{-7} \times D$ où M_n est la masse molaire à une dose absorbée D et M₀ la masse molaire initiale du polysaccharide. Cette relation permet de contrôler facilement la dépolymérisation en fonction de la dose appliquée.

La dépolymérisation de polysaccharides tels que les alginates, les pectines, le chitosane ou le carraghénane par irradiation gamma s'accompagnent de changements chimiques : changement de la composition en sucres, diminution du degré de polymérisation, formation de nouvelles fonctions, coupures de liaisons glycosidiques... [1]. Ces changements ont été mis en évidence par UV, par IR et par le dosage, le cas échéant, des sulfates. De nouveaux pics d'absorption correspondant à la formation de groupements carbonyles, carboxyliques ou de doubles liaisons sur le cycle pyranosique ont été ainsi observés. Ces changements chimiques peuvent s'expliquer par la nécessité d'un réarrangement du radical formé après scission de la chaîne (figure 2). Pour les polysaccharides sulfatés, des dosages ont montré la diminution du nombre de groupements sulfates après irradiation gamma, quelque soit la position du groupement.

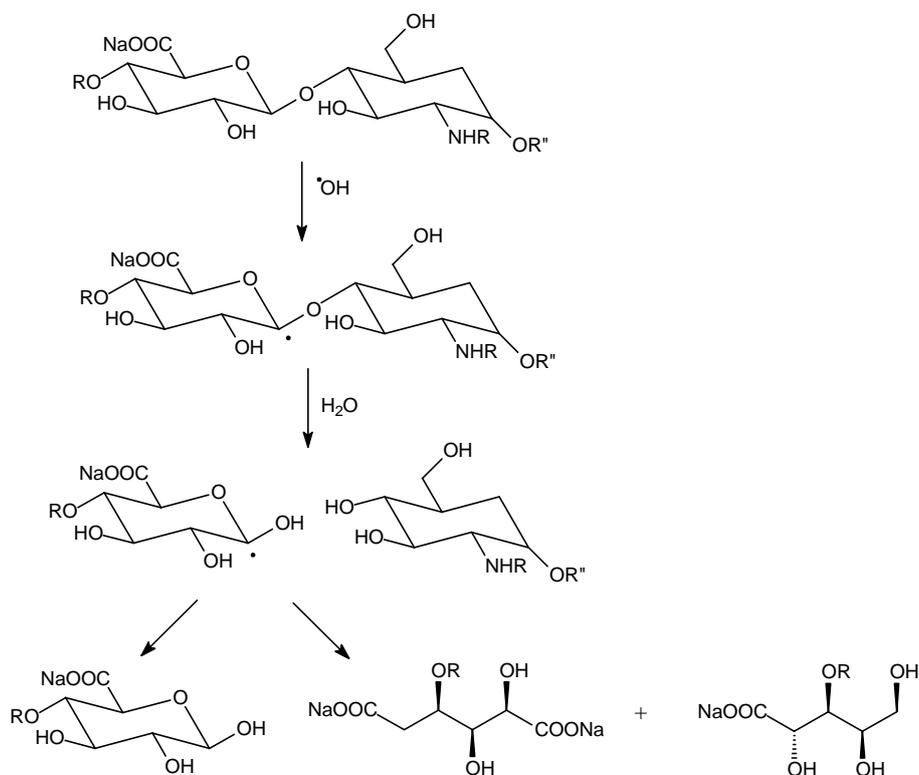


Figure 2: Mécanisme de scission de la liaison glycosidique proposé pour l'héparine γ -irradiée [5]

Des études ont également été réalisées sur l'héparine afin de mieux préserver la structure du polymère après dépolymérisation [5]. Lors de l'irradiation par rayonnement gamma, différents radicaux

sont produits de façon non sélective et sont ensuite transformés par hydrolyse, réarrangements, élimination d'eau ou de dioxyde de carbone. Le but de ces études est de focaliser les réactions radicalaires induites vers la dépolymérisation afin de diminuer la formation de réactions secondaires et d'obtenir des produits plus propres. De petites molécules possédant des liaisons C-H faibles, faciles à éliminer tels que les alcools, peuvent être introduites et influencer la dépolymérisation : de par leurs structures elles n'entrent pas en compétition avec les radicaux anomériques générés mais rivalisent avec succès avec les radicaux non-anomériques limitant ainsi les réactions secondaires.

Ce procédé a déjà fait l'objet de brevets concernant la dépolymérisation de l'héparine [6], de chitine/chitosane [7] et de l'amidon [8].

1.2- Faisceau d'électrons

Par rapport aux irradiations gamma, cette voie n'utilise pas de sources radioactives. A l'échelle du laboratoire, un faisceau d'électrons servant à la stérilisation du matériel médical peut être utilisé. Les polysaccharides peuvent être sous forme solide ou aqueuse, mais la pénétration limitée des radiations des accélérateurs d'électrons à faible énergie limite les applications possibles [9]. L'utilisation de pompes à vide permet d'améliorer les conditions de circulation des électrons qui sont autrement freinés par l'air qui se trouve autour de la cathode générant le faisceau. Pour ne pas avoir d'atténuation du faisceau, l'échantillon est placé aussi près que possible de celui-ci.

Lorsque le polysaccharide est sous forme solide il doit être aplati afin que le faisceau pénètre de la même façon dans son ensemble et réduire ainsi l'indice de polydispersité. Des fragments plus petits sont observés lorsque le polysaccharide dépolymérisé se trouve sous forme liquide. Le design de l'appareil doit prévoir une forte agitation pendant l'irradiation pour faciliter la dépolymérisation [1]. Des problèmes peuvent se poser lorsque la solution à dépolymériser est trop visqueuse : une augmentation de la température peut permettre de contrer le problème. Une distribution de taille plus étroite est également obtenue en augmentant les doses de radiation.

La dose choisie, et donc le temps d'irradiation qui y est associé, va dépendre du degré de dépolymérisation souhaité et du type de polysaccharide. Cette dose est généralement comprise entre 400 et 800 kGy. Un générateur de faisceau à haute tension (1-10 MeV) est préférentiellement utilisé pour une meilleure pénétration du polysaccharide [10].

Les problèmes de changements de compositions chimiques observés sont comparables à ceux obtenus avec les radiations ionisantes gamma. Des études ont montré que l'augmentation de la proportion de groupes terminaux réducteurs était proportionnelle à la dose de radiation [11]. Il s'est également avéré que le ratio molaire en groupements réducteurs du polysaccharide n'évoluait pratiquement pas entre le polysaccharide natif et le dépolymérisé. Ainsi, la dépolymérisation entraîne une libération uniterminale de fonctions aldéhydes avec peu ou pas de liaisons aldéhydes créées le long de la chaîne carbohydrate ou sur l'extrémité terminale opposée. La dépolymérisation s'accompagne également d'une diminution de la viscosité. Celle-ci et l'augmentation des groupements terminaux réactifs sont des facteurs qui contribuent à augmenter la fréquence de formation des liaisons covalentes. Le clivage des liaisons β -glycosidiques se fait de manière non sélective [11]. Tout comme pour les radiations gamma, l'ajout d'alcool, d'éthers, d'aldéhydes, d'amides ou d'acide

formique est proposé afin de focaliser les réactions radicalaires induites vers la dépolymérisation et réduire ainsi les modifications de composition chimique induites par des réactions secondaires [12].

En résumé, il s'agit d'une méthode reproductible qui permet l'obtention de fragments de taille uniforme. Le coût est ici proportionnel à la dose d'irradiation et non à la quantité de polysaccharide irradiée.

1.3- Irradiation UV

Si la dépolymérisation de polysaccharides par irradiation UV a été mise en évidence il y a de nombreuses années [13] elle a longtemps été considérée seulement en tant que méthode de dégradation, son potentiel industriel ne s'est développé que récemment [14,15].

Plusieurs types de lampes montées en séries ou en parallèles peuvent être utilisées pour émettre des rayonnements ultraviolets : lampe aux halogénures métalliques, lampe au mercure haute pression, lampe xénon, lampe xénon-mercure. Les rayonnements compris entre 250 (en dessous les émissions sont trop faibles) et 450 nm constituent le domaine de plus grande efficacité de la dépolymérisation.

Pour une meilleure efficacité de la dépolymérisation et pour une meilleure homogénéité de celle-ci, le polysaccharide est préférentiellement mis en solution dans l'eau à des concentrations de l'ordre de 1 à 2% en masse pour des problèmes de viscosité.

D'autre part, il a été montré qu'une relation du type $Y=aX+b$ où Y serait l'inverse de la masse molaire du polysaccharide dépolymérisé, X serait la quantité de rayons ultraviolets et a et b des constantes dépendantes du polysaccharide dépolymérisé pouvait être établie. Cette relation permet ainsi de produire de façon simple et extrêmement efficace des polysaccharides du type glycosaminoglycane (comme l'héparine, l'acide hyaluronique ou la chondroïtine) d'une masse souhaitée [14].

Le problème posé par l'irradiation par ultraviolets est celui de la dégradation thermique qui peut être engendrée. La température doit donc être contrôlée par circulation d'eau ou d'air. Le procédé proposé dans la figure 3 offre un système de refroidissement efficace qui permet un traitement continu du polysaccharide à dépolymériser.

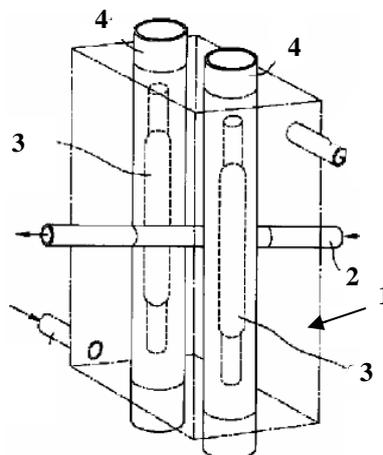


Figure 3: Appareil ultraviolet permettant un traitement continu 1: réservoir à eau 2: pipeline transparent pénétrant 1 et transportant la solution de polysaccharide 3: lampe ultraviolets installée dans le réservoir 1 4: tube protégeant la lampe ultraviolets du refroidissement [16]

La photodégradation de polymère est complexe car de nombreux processus peuvent se produire simultanément ou successivement lors de la dégradation.

En effet, les molécules soumises à une radiation lumineuse absorbent l'énergie et passent dans un état excité, dont l'évolution ultérieure conduit aux « photoproduits ». L'énergie absorbée est alors comparable en magnitude à l'énergie de dissociation de liaisons associées aux molécules organiques ce qui induit le phénomène de dépolymérisation. L'étude de la résonance de spin par résonance de spin électronique montre que les radicaux formés pendant l'exposition des échantillons aux radiations UV sont similaires à ceux produits lors de l'irradiation gamma [17,18] avec formation de radicaux en position C₁ (Figure 2) ou à ceux générés par l'ajout de sulfites ou d'acide ascorbique par exemple [19]. Cependant le mécanisme de dégradation n'est pas toujours parfaitement maîtrisé. On peut supposer que les radicaux libres générés peuvent être piégés par l'oxygène présent dans l'eau et que la liaison oxygène-oxygène résultante peut être cassée par un mécanisme similaire à l'autoxydation provoquée par l'oxygène atmosphérique et les rayonnements du soleil. Cependant, il a été montré que la réaction se produisait également en absence d'oxygène, laissant supposer l'existence d'autres mécanismes. Enfin pour mieux contrôler les réactions de dégradation, il apparaît nécessaire de travailler à une longueur d'onde donnée [20].

1.4- Microondes

Mise à part l'utilisation des microondes pour l'hydrolyse de l'amidon [21, 22], la littérature est assez pauvre concernant la dépolymérisation de polysaccharides par cette voie. Pourtant, les microondes sont récemment devenues une méthode largement utilisée dans des domaines variés de la chimie (synthèse, concentration de solution, mise en température, chimie des plasmas...).

L'échauffement par microondes va entraîner une absorption directe d'énergie par les groupements fonctionnels ce qui donne naissance à une conductivité ionique ou à une rotation de dipôle. Cette énergie est ensuite libérée dans la solution environnante. Cette absorption d'énergie entraîne une plus grande réactivité des groupements fonctionnels avec les réactifs présents dans le milieu que lorsqu'ils sont simplement mis en contact avec ces réactifs à la même température [22].

Les microondes sont généralement utilisées comme catalyseur de réaction en présence d'acides ou de sels. Cette technique peut être utilisée pour la dépolymérisation totale d'échantillons dans le cadre d'analyses. Elle présente l'avantage de réduire considérablement le temps de l'hydrolyse et les quantités d'acide nécessaires. Par exemple, dans le cas de l'hydrolyse de gommés *Guar* et *Ipomoea quamoclit* [23], les mêmes résultats ont été obtenus en 2 min et avec 0,1N d'H₂SO₄ pour les microondes contre 48h et 2N d'H₂SO₄ pour les méthodes conventionnelles.

Différents paramètres permettent de contrôler la dépolymérisation et d'obtenir des masses molaires variées de polymère : la pression, la puissance, le temps d'irradiation et/ou les ajouts.

Les dosages chimiques et les spectres permettent de confirmer que la dépolymérisation par microondes n'entraîne pratiquement pas de changements de la structure et de la constitution dans certaines conditions [24] et [25]. Ceci suggère que la scission de chaîne par les radicaux libres se fait de façon aléatoire pendant la dépolymérisation.

La réaction peut encore être accélérée en couplant l'action des microondes avec l'ajout de sels inorganiques [26]. En effet, la présence de sels dans des solvants polaires accroît le facteur de perte

diélectrique et l'effet des microondes sur le solvant. L'addition de sels peut donc améliorer le phénomène de surchauffe et donc la rapidité de la réaction.

Les avantages principaux de cette méthode par rapport aux autres méthodes thermiques sont qu'elle permet d'obtenir de meilleurs rendements, en diminuant les temps de réaction, en limitant la formation de produits secondaires et en réduisant le phénomène de dégradation thermique.

Parmi les différentes voies physiques de dépolymérisation, nous avons choisi de développer l'utilisation des ultrasons qui avait déjà fait l'objet d'une étude prospective lors d'une collaboration entre l'Ifremer et l'ENSCR.

2- La sonochimie en dépolymérisation

La sonochimie se définit comme l'étude et l'utilisation des transformations induites par les ondes acoustiques, communément appelées les ultrasons.

Les premières mentions dans la littérature sont déjà anciennes, puisque datant de 1927 [27]. Cependant seuls les aspects phénoménologiques ont été abordés jusqu'à la fin des années 70.

2.1-Quelle est l'origine physique de la sonochimie ? [28]

Les fréquences de vibration moléculaire les moins énergétiques se situent dans une gamme de 10^{14} - 10^{16} s⁻¹. Or, contrairement aux radiations lumineuses, les fréquences utilisées en sonochimie ne sont que de l'ordre de 10^4 - 10^7 s⁻¹. Un phénomène relais existe donc: la cavitation. Ce phénomène est très complexe faisant encore l'objet d'études afin d'améliorer sa compréhension. Dans un liquide soumis à une vibration acoustique, la succession de compressions et de dépressions conduit à la formation de microbulles qui contiennent des gaz dissous dans le milieu et des vapeurs de celui-ci. Ces bulles possèdent une mécanique propre et peuvent imploser ou se fragmenter selon deux processus (figure 4).

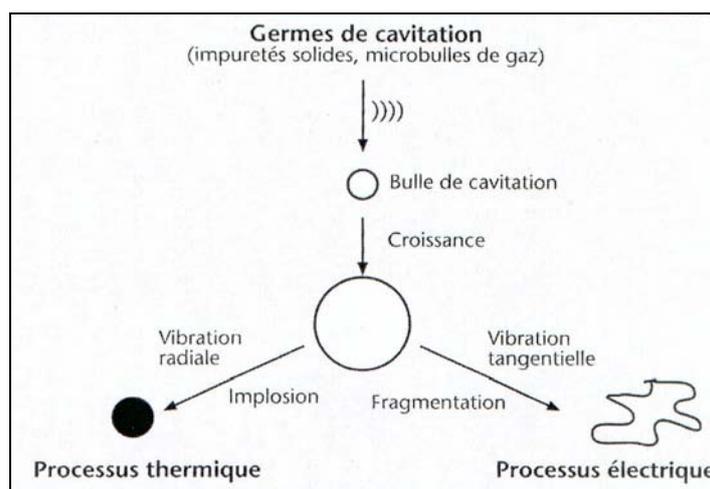


Figure 4 : Dynamique des bulles [29]

Dans le premier cas, celui de la cavitation transitoire, l'implosion se produit en environ 10^{-6} s, en conditions adiabatiques, et le contenu de la bulle, fortement comprimé (plusieurs centaines de bars), se trouve porté à hautes températures, 5000 K selon certains auteurs [30]. Il peut donc exister une

parenté entre la sonolyse et la thermolyse-éclair (action directe), à ceci près que cette dernière, qui se produit en des temps de l'ordre de 10^{-3} s, est donc 1000 fois plus lente que l'implosion cavitationnelle. Cette théorie du « point chaud » [31] n'est pas suffisante pour expliquer la totalité des observations expérimentales. Une autre approche considère la fragmentation des bulles (action indirecte), après un temps de vie relativement long (cavitation stable) [32,33]. Celle-ci s'accompagne d'une réorganisation des couches moléculaires séparant la phase continue de l'intérieur de la bulle. A proximité des zones de fragmentation, des champs électriques considérables apparaissent ($>10^{10}$ Vm⁻¹), dont l'effet est d'éjecter des électrons du solvant ou du soluté, produisant des radicaux et des radicaux ions. La sonochimie serait donc ainsi le domaine privilégié des processus radicalaires ou de transfert d'électrons. De plus, la cavitation s'accompagne d'effets mécaniques importants. Dans un milieu hétérogène, ceux-ci se manifestent d'une manière visible, par l'émulsification de liquides non miscibles ou l'érosion des solides. D'autre part en solution homogène, les processus ioniques sont insensibles à la sonication. En revanche, les processus radicalaires donnent lieu à une exaltation. Que l'on soit en phase homogène ou hétérogène, lorsqu'un processus chimique peut réagir simultanément selon un mécanisme ionique ou radicalaire, on pourra observer ce que Ando et al [34] ont appelé la « commutation sonochimique ». Un exemple de commutation sonochimique est donné figure 5 : la réaction de l'acide nitrique concentré sur les alcools peut conduire à l'ester nitrique par un mécanisme ionique en l'absence d'ultrasons alors que la sonication fournit un tout autre produit, l'acide carboxylique, issu d'un mécanisme faisant intervenir la décomposition radicalaire du réactif en oxyde d'azote NO₂ [35]. La sonolyse de réactifs ou même des solvants en entités radicalaires est une caractéristique générale de la sonochimie : aucune molécule n'est inerte sous irradiation ultrasonore, même l'eau, qui fournit le radical hydroxyle et l'hydrogène atomique [36].

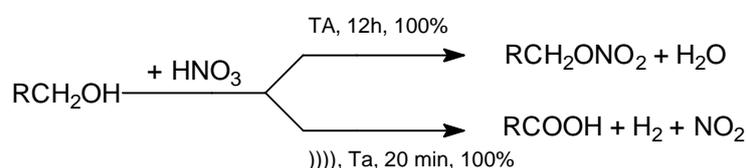


Figure 5 : Exemple de commutation sonochimique

On notera enfin que le phénomène de cavitation, essentiel en sonochimie, dépend de nombreux paramètres : la présence de gaz, la pression externe, la viscosité du solvant, la tension de surface, la pression de vapeur, la température à laquelle se fait l'expérience, la puissance du processeur et la fréquence d'irradiation [37].

2.2-Les ultrasons en dépolymérisation

Les premières études d'hydrolyses de macromolécules naturelles (amidon, gomme arabique et agar) assistées par ultrasons ont été publiées dès 1933 [38].

Des études menées sur des polymères tels que l'ADN ou la cellulose ont montré que les hautes fréquences (> 1 MHz) favorisent la dégradation thermique avec la production de gaz tels que CO et CO₂ [39]. La dépolymérisation a lieu à l'interface entre la solution et les microbulles de cavitation. La vitesse de la réaction peut être directement mise en relation avec la vitesse de déshydratation et la capacité du polymère à réduire la tension d'interface [40].

Aux faibles fréquences, le phénomène de dégradation thermique est supprimé, et la dépolymérisation est alors uniquement le fait de ruptures de liaisons C-C. Ce mécanisme peut s'expliquer par la puissance de la force de cisaillement hydrodynamique produite dans le liquide au voisinage de la zone de cavitation [41]. Portenlänger et Heusinger ont mené une étude sur l'importance de la fréquence de l'irradiation pour la dépolymérisation de dextrans [42]. Cette étude a montré que la dépolymérisation la plus efficace (plus faibles masses molaires et distributions les plus étroites) était obtenue pour la plus faible fréquence étudiée (35 kHz).

D'autre part, les modèles mathématiques concernant la dégradation de polymères par les ultrasons sont nombreux. Certains auteurs considèrent que le processus de dégradation ultrasonique doit être modélisé par une réaction en plusieurs étapes. Cependant avec un temps d'exposition court, la réaction peut être considérée comme étant du premier ordre.

Ainsi, dans les toutes premières minutes, l'équation cinétique de Malhorta, similaire à celles proposées pour les dépolymérisations par irradiations gamma (1.1-) et UV (1.3-), peut être utilisée pour déterminer une constante de réaction concernant la dégradation ultrasonique des polymères:

$$\frac{1}{M_{n,t}} = \frac{1}{M_{n,0}} + kt$$

$M_{n,t}$: masse molaire moyenne en nombre à l'instant t

Basedow et Ebert ont montré que la valeur de k était dépendante de la longueur du polymère et de sa concentration [43].

A la différence de la dégradation thermique qui est, en majeure partie, réalisée au hasard, la coupure de la liaison se fait en milieu de chaîne lors de la dépolymérisation par ultrasons [37]. La force nécessaire à la rupture des liaisons est donc dépendante de la longueur du polysaccharide, une exposition prolongée aux irradiations ultrasoniques permet une diminution de la masse molaire finale. Avec l'augmentation du temps d'irradiation, les échantillons de haute masse molaire ($M_w > 10^4$) tendent à adopter une distribution monomodale avec une polydispersité réduite [44]. Cependant la dégradation la plus efficace se produit dans les premières minutes. Enfin, l'ensemble des études réalisées a montré que l'utilisation des ultrasons seuls ne permettait pas de descendre en dessous d'une limite de 50 000 Da.

2.3-Les ultrasons et l'industrie

Les problèmes rencontrés lors de la transposition à grande échelle des ultrasons sont à la fois ceux de la transposition des paramètres opératoires et ceux liés aux traitements de grands volumes.

Les barrières techniques rendent impossible l'augmentation de la puissance des transducteurs indéfiniment impliquant d'autres solutions pour contourner le problème et réussir à transmettre autant de puissance volumique au liquide que lors des applications à l'échelle du laboratoire.

L'efficacité d'un système sonochimique se juge essentiellement sur la transmission d'énergie. Le matériel ultrasonique comprend de nombreuses sources potentielles de dissipation d'énergie. Tout d'abord, il y a la possibilité de perte d'énergie au niveau du transducteur lors de la transformation de l'énergie électrique en énergie ultrasonore. Ensuite il y a des pertes d'énergies mécaniques car tous les ultrasons créés ne sont pas transformés en énergie de cavitation. Enfin toute l'énergie présente au niveau de la cavitation n'est pas transformée en « activité chimique » mais en majorité en énergie

thermique provoquée par l'effondrement des bulles lors de la cavitation. Les procédés industriels doivent donc tenir compte de ces problèmes d'efficacité énergétique. On distingue essentiellement deux systèmes de production industriels : le fonctionnement par « batch » et celui en flux continu.

Les avantages principaux de l'utilisation d'un flux continu résident dans l'absence de surchauffe et la diminution de la puissance nécessaire à chaque instant permettant de traiter plus facilement de grands volumes. Dans les systèmes à flux continu la durée d'irradiation par les ultrasons doit être considérablement allongée pour que le liquide soit exposé de la même façon aux ultrasons que lors d'un fonctionnement en batch. Ce système est donc plus adapté à des manipulations ne nécessitant pas une longue exposition aux ultrasons. De plus, autre inconvénient, l'utilisation d'une pompe pour faire circuler la solution de polysaccharide limite la viscosité et donc la concentration de la solution à soniquer. Enfin, les systèmes à flux continu demeurent difficiles à mettre au point car leur efficacité dépend de nombreux paramètres.

Les problèmes liés à la puissance, à l'efficacité et à l'homogénéité de l'action des ultrasons imposent la conception de systèmes spécifiques à la sonochimie lorsque le traitement par « batch » est appliqué au traitement de volumes importants. Ces systèmes doivent également prendre en compte les problèmes de montée en température observés en batch. Différents dispositifs sont proposés aux industriels parmi lesquels:

- L'utilisation d'un réacteur comprenant un dispositif de plusieurs transducteurs couplés permettant ainsi de traiter plusieurs centaines de litres et un système de réfrigération (flux d'air, eau).
- Les systèmes dits en « semi-batch », ceux-ci comprennent un réservoir et une boucle de recirculation alimentant en continu le réacteur de sonication. Cette solution permet d'allier les avantages du batch et ceux du traitement en continu.

Même si l'utilisation industrielle des ultrasons pour dépolymériser n'en est qu'à ses débuts il est d'ores et déjà possible de trouver des installations capables de soniquer une centaine de litres comme le procédé Sonitube proposé par Sodeva (Figure 6).



Figure 6 : Process Sonitube proposé par Sodeva : Le produit contenu dans un réservoir approprié circule en boucle. Le réservoir peut être à double enveloppe avec circulation d'un liquide de refroidissement, pour maintenir le produit dans une fourchette de température précise, si nécessaire. Ce process peut permettre le traitement d'une centaine de litres de produit.

3- Matériel et méthodes générales de caractérisation

3.1- Les EPS utilisés

Ces travaux de thèse ont été essentiellement réalisés sur un lot industriel (lot LCO 105 C3) de l'EPS HYD 657. La production de cet EPS et ses caractéristiques ont été exposées dans l'introduction générale (paragraphe 5). Les masses molaires de ce lot ont été déterminées par détection réfractométrique avec couplage en diffusion de lumière au laboratoire Polymères, Colloïdes et interfaces de l'UMR 6120 à l'Université du Maine. Ce lot possède une masse molaire moyenne de $3.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ en équivalent pectine très supérieure à celle obtenue pour la majorité des lots ($1,6.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$).

Des études préliminaires ont été réalisées sur un autre lot industriel d'EPS HYD 657 (lot 00 02 086 LN) qui possède une masse molaire moyenne d'environ $1,6.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$.

De plus, trois autres EPS, GY 785, HE 800 et MS 907, ont déjà fait l'objet d'une étude prospective de dépolymérisation par les ultrasons [45]. Les caractéristiques de ces EPS vont être brièvement rappelées.

Lors de la campagne Guaynaut effectuée en 1991 sur le bassin des Guaymas dans le Golfe de Californie, des échantillons d'eau de mer prélevés près des sources hydrothermales, ont permis d'isoler la souche GY 785 appartenant à un genre connu *Alteromonas* mais d'une espèce nouvelle nommée *infernus* [46]. L'EPS produit par cette souche possède une unité composée de neuf résidus dont la particularité est la présence d'une ramification elle-même substituée (figure 7). Le départ de cette ramification est composé de deux acides glucuroniques, substitué par deux glucoses, d'un galactose et d'un glucose. La chaîne principale est composée d'un résidu glucose, d'un résidu galactose et d'un acide galacturonique trisubstitué portant un groupement sulfate en position 2 [47].

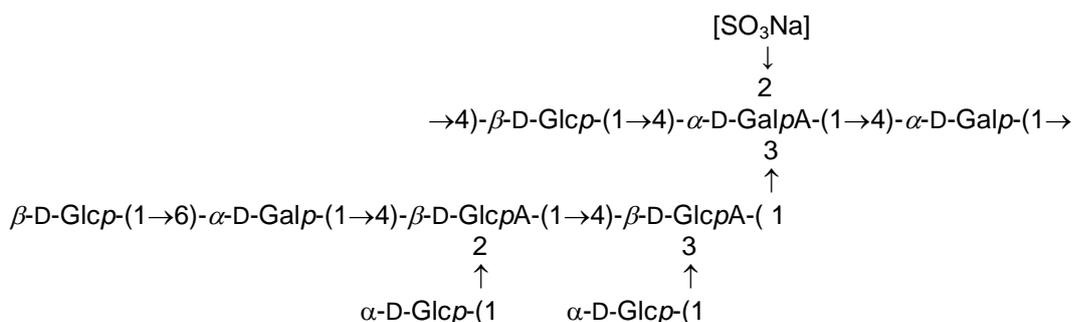


Figure 7 : Structure de l'unité de répétition de l'exopolysaccharide GY 785 sécrété par *Alteromonas infernus*

La souche HE 800 appartient elle aussi à un genre connu *Vibrio* mais à une espèce totalement nouvelle appelée *diabolicus*. Elle a été isolée à partir de tissus d'invertébrés prélevés lors de la campagne Hero en 1991 qui s'est déroulée sur la ride du Pacifique oriental [48]. Le HE 800 a la particularité de posséder des oses aminés N-acétylés dans les mêmes proportions que les acides uroniques (33 et 32%). Son unité répétitive (figure 8) est constituée d'un tétrasaccharide linéaire composé de deux acides glucuroniques, d'une N-acétylglucosamine et d'une N-acétylgalactosamine [49].

Une syntonisation de la sonde est réalisée régulièrement. Celle-ci augmente l'efficacité et assure un transfert maximum d'énergie, en adaptant la fréquence du générateur d'ultrasons à celle du dispositif convertisseur/sonde.



Figure 10: Montage utilisé au laboratoire pour dépolymériser à basses fréquences

- **Essais à basse fréquence à l'échelle du « petit-pilote »**

Un essai petit pilote a été réalisé par Nicolas Gondrexon dans le laboratoire Electrochimie et Physico-chimie des Matériaux et des Interfaces de l'UMR 5361 (Grenoble) sur un dispositif « fait maison » basses fréquences en mode pseudo-batch avec une boucle de recirculation de la solution (figure 11).

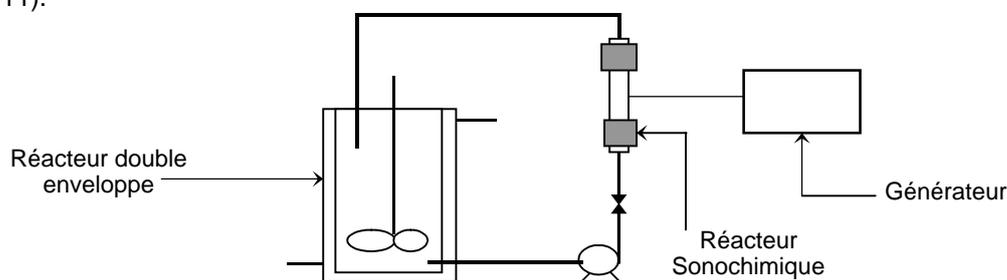


Figure 11: Montage utilisé pour une extension d'échelle à basses fréquences

Neuf litres d'une solution d'HYD 657 à 2 g/L ont ainsi été soumis à 15 h d'exposition aux ultrasons. Le débit de la boucle de recirculation a été fixé à $120\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ et la température moyenne à 21°C . La puissance ultrasonore transmise a été estimée inférieure à 100 W.

- **Essais à haute fréquence**

Une technologie dont la fréquence de fonctionnement relève du domaine des ultrasons de haute fréquence fonctionnant en batch sur des volumes de 1-2 litres a été utilisée. Cette étude a également été réalisée par Nicolas Gondrexon.

Un litre d'une solution d'EPS HYD 657 à 2 g/L a été soumis à 15 h d'exposition aux ultrasons. La température moyenne pendant l'expérience a été fixée à 22°C . La puissance ultrasonore transmise a été estimée à 32 W.

b) Modes opératoires utilisés pour le traitement par les ultrasons en présence d'H₂O₂

Différents protocoles ont été utilisés lors du traitement par les ultrasons en présence d'H₂O₂. Des protocoles types sont présentés ci-dessous :

- **Ajout en 1 fois de H₂O₂:**

10 ml d'EPS à une concentration initiale de 2g/l sont placés sous ultrasons. Lorsque le mélange atteint la température de consigne de 60°C, la quantité d'H₂O₂ permettant d'obtenir le rapport massique H₂O₂/EPS désiré, est ajoutée. La durée d'exposition totale aux ultrasons est de 2h, soit 4h d'expérience (2s de pulse/ 2s d'arrêt).

- **Ajout continu de H₂O₂:**

5 ml d'EPS à une concentration initiale de 4g/l sont placés sous ultrasons. Lorsque le mélange atteint la température de consigne (60°C), l'ajout de l'H₂O₂ permettant d'obtenir le rapport massique H₂O₂/EPS désiré après 100 minutes, commence. La durée d'exposition totale aux ultrasons est de 2h, soit 4h d'expérience pour un pulse 2s :2s. La concentration finale en EPS est de 2g/l.

- **Ajout différé du peroxyde d'hydrogène :**

5 ml d'EPS à 4g/l sont placés sous ultrasons, la température de consigne est fixée à 60 °C. Après 45 minutes, l'ajout en continu de l'H₂O₂ nécessaire sur 100 minutes commence. La durée d'exposition totale aux ultrasons est de 2h, soit 4h d'expérience pour un pulse 2s :2s.

Les mélanges sont ensuite congelés avant d'être lyophilisés.

3.3- Les plans d'expériences [51, 52]

Les plans d'expériences sont utilisés comme stratégie pour conduire plus rapidement aux résultats espérés en rationalisant les expériences réalisées et en évitant donc de réaliser des expériences inutiles. La différence capitale avec la méthode classique tient au fait que l'on fait varier les niveaux de tous les facteurs à la fois à chaque expérience mais de manière programmée et raisonnée.

Les plans d'expériences permettent l'étude de nombreux facteurs tout en maintenant les essais à un nombre raisonnable, c'est pourquoi l'une de leurs applications principales est la recherche de facteurs influents ce qui consiste :

- à fixer deux valeurs seulement pour chaque facteur, ces valeurs sont dénommées niveaux ;
- à étudier un grand nombre de facteurs, même ceux, qui semblent, à priori, ne jouer qu'un faible rôle.

Cette méthode permet de détecter tous les facteurs influents tout en maintenant le nombre d'expériences au juste nécessaire.

L'étude de plans factoriels fractionnaires, qui sera utilisée lors de nos études, permet de diminuer considérablement le nombre des expériences en focalisant l'attention sur les effets les plus intéressants. Il est possible d'obtenir des informations intéressantes concernant l'influence de k facteurs sur la réponse en ne réalisant qu'une fraction du plan complet 2^k. Dans un plan fractionnaire 2^{k-p} :

- 2 désigne le nombre de niveaux par facteurs
- k le nombre de facteurs étudiés

- p le nombre de facteurs confondus (« aliasés ») délibérément

Contrairement aux plans complets, ce ne sont plus les effets des facteurs et de leurs interactions qui sont obtenus directement mais les combinaisons des effets et des interactions, c'est à dire des contrastes. Un contraste se définit par la somme des effets et des interactions qui ont la même suite de signes + et – dans un des demi-plans et dans l'autre par la différence des effets et des interactions qui ont des suites de signes opposés.

Des essais supplémentaires peuvent se révéler nécessaires afin de lever les ambiguïtés, on réalise alors des plans complémentaires.

Hypothèses avec lesquelles nous travaillerons:

- Les interactions d'ordre supérieur à 2 sont négligées
- Si un contraste est nul chacun de ses termes l'est aussi

Le détail des calculs figure en annexes à la fin de cette partie.

3.4- Les techniques d'analyses

a) Détermination des masses molaires

Les masses molaires moyennes (M_n : moyenne en nombre, M_w : moyenne en masse), la masse molaire au pic M_p et la polydispersité, $I_p = \frac{M_w}{M_n}$, ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC).

La masse molaire moyenne en nombre M_n est le rapport de la masse totale de tous les fragments dans un échantillon divisé par le nombre total des fragments de l'échantillon :

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \text{ où } M_i \text{ représente la masse molaire de l'espèce } i \text{ et } N_i \text{ représente le nombre de}$$

molécules de l'espèce i .

La masse molaire moyenne en masse M_w est définie par la formule :

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}, \text{ elle est basée sur le fait qu'une molécule plus grosse contient davantage de la}$$

masse totale de l'échantillon de polymère qu'une molécule plus petite.

Le rapport de ces deux valeurs permet de caractériser globalement la dispersité des masses molaires d'un mélange de polysaccharides, c'est l'indice de polydispersité I_p .

Différentes analyses HPSEC ont été réalisées sur un même échantillon afin de vérifier la cohérence des résultats obtenus entre les laboratoires de l'ENSCR et ceux de l'Ifremer qui utilisent du matériel différent (colonne, détecteur, traitement des données). Pour les différentes conditions, des résultats similaires sont obtenus pour la masse molaire moyenne en masse M_w . Par contre, les valeurs de la masse molaire moyenne en nombre M_n sont plus faibles dans le cas de la colonne utilisée par l'ENSCR entraînant un indice de polydispersité plus important.

L'inconvénient majeur de l'HPSEC c'est que celle-ci mesure plus un volume hydrodynamique que des masses molaires. Aussi des facteurs tels que la conformation de la molécule ou son degré de solvataion sont connus pour affecter la masse molaire apparente [53]. Ceci est particulièrement vrai dans le cas de polymères chargés comme l'EPS étudié. Il est donc important de préciser que

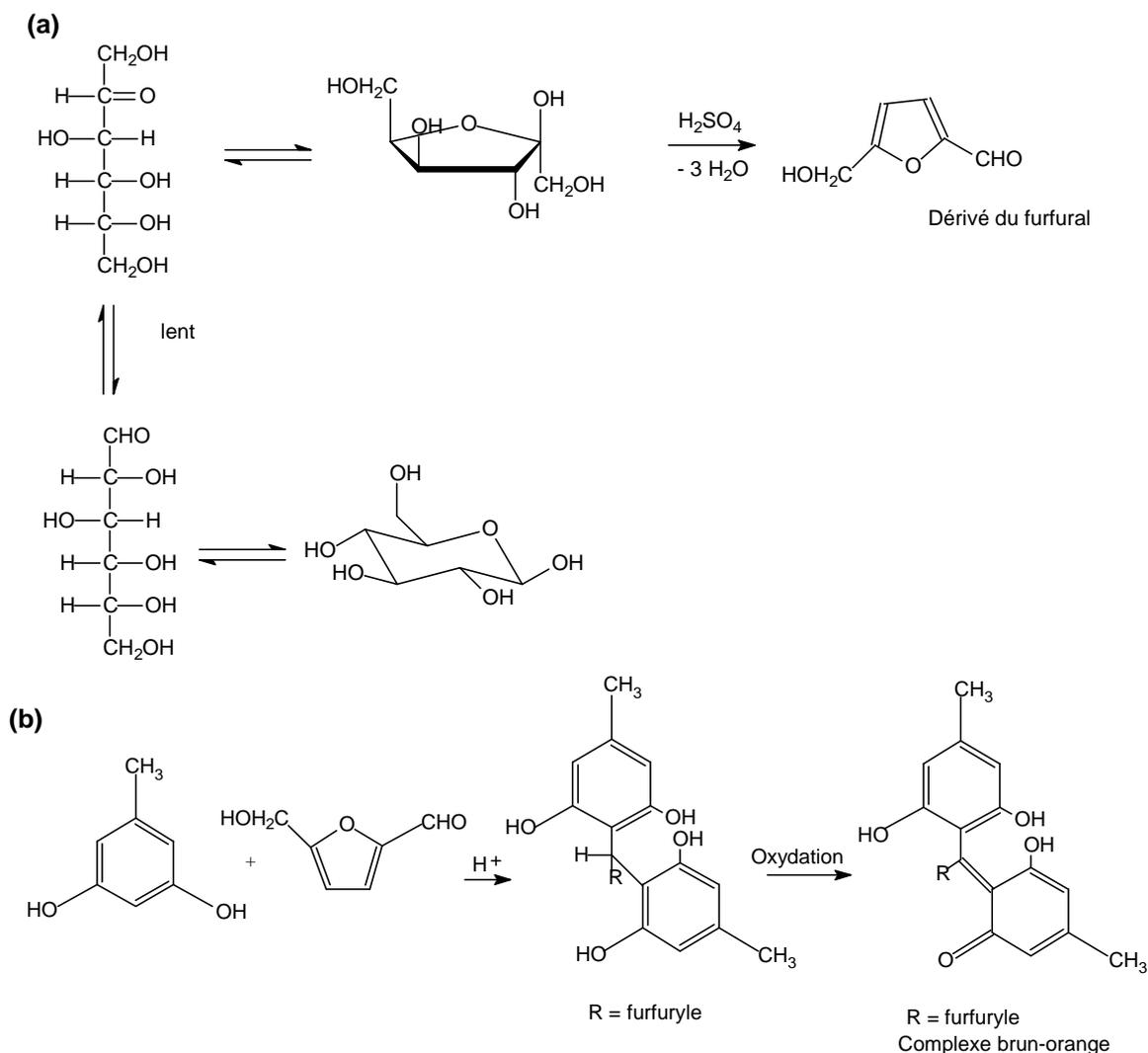
l'étalonnage a été réalisé avec des standards de pullulanes [54] qui sont uniquement composés d'oses neutres alors que les polysaccharides caractérisés lors de cette étude possèdent des acides uroniques. Le problème est qu'il n'existe pas de standards commerciaux de polysaccharides chargés. Par conséquent l'étalonnage réalisé ne permet pas de mesures exactes de masses molaires mais donne une masse exprimée en équivalent pullulanes permettant de comparer les échantillons entre eux.

b) Détermination de la composition osidique globale

Les teneurs en oses totaux et en oses acides ont été déterminées par des méthodes colorimétriques.

- Dosage des oses par l'Orcinol [55]

Ce dosage repose sur l'action de l'acide sulfurique concentré à chaud qui provoque une hydrolyse de toutes les liaisons osidiques et une déshydratation des monosaccharides libérés pour donner des dérivés de furfural (figure 12a). Les formes cétooses forment plus rapidement des furanoses que les aldoses et ces furanoses se déshydratent rapidement pour former des furfurals. Les aldoses sont convertis en furanoses seulement après un chauffage prolongé.



Figures 12 : Mécanismes de dosage des oses neutres par l'orcinol **(a)** Formation des dérivés de furfural **(b)** réaction avec l'orcinol

Les dérivés du furfural obtenus se condensent ensuite avec l'orcinol (3,5-hydroxytoluène) en milieu acide pour donner un complexe de couleur brun-orange (figure 12b). La lecture de l'absorbance se fait à 420 nm, la sensibilité étant plus importante qu'à 510 nm (on réduit les interférences des acides uroniques et des déoxy sucres).

- Dosage des acides uroniques [56,57]

Le mécanisme de formation des furfurals est le même que ci-dessus. Les dérivés furfurals des acides uroniques réagissent avec le 3-hydroxybiphényl, une coloration rose est lue à 525 nm. La coloration rose est améliorée en présence de borate mais la réaction colorimétrique est sensible aux interférences dues aux sucres neutres qui brunissent en présence d'acide sulfurique. Cette interférence est minimisée par traitement de l'échantillon avec du sulfamate avant l'hydrolyse acide.

c) Détermination de la composition en monosaccharides du polymère

Après leur libération lors de la méthanolyse du polysaccharide, les résidus glycosidiques sont transformés en méthylglycosides O-triméthysilylés selon la méthode de Kamerling *et al.* [58] modifiée par Montreuil *et al.* [59] (figure 13). Leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet de déterminer la composition en monosaccharides du polymère.

L'identification des oses neutres et des acides uroniques est réalisée lors de la même injection par comparaison des temps de rétentions relatifs à l'étalon interne. Un coefficient de réponse propre à chaque résidu est également appliqué pour quantifier chaque monosaccharide.

Il n'existe aucune méthode analytique permettant une coupure parfaite du polysaccharide en monosaccharides : l'hydrolyse est partielle et les résultats sont donc relativement qualitatifs.

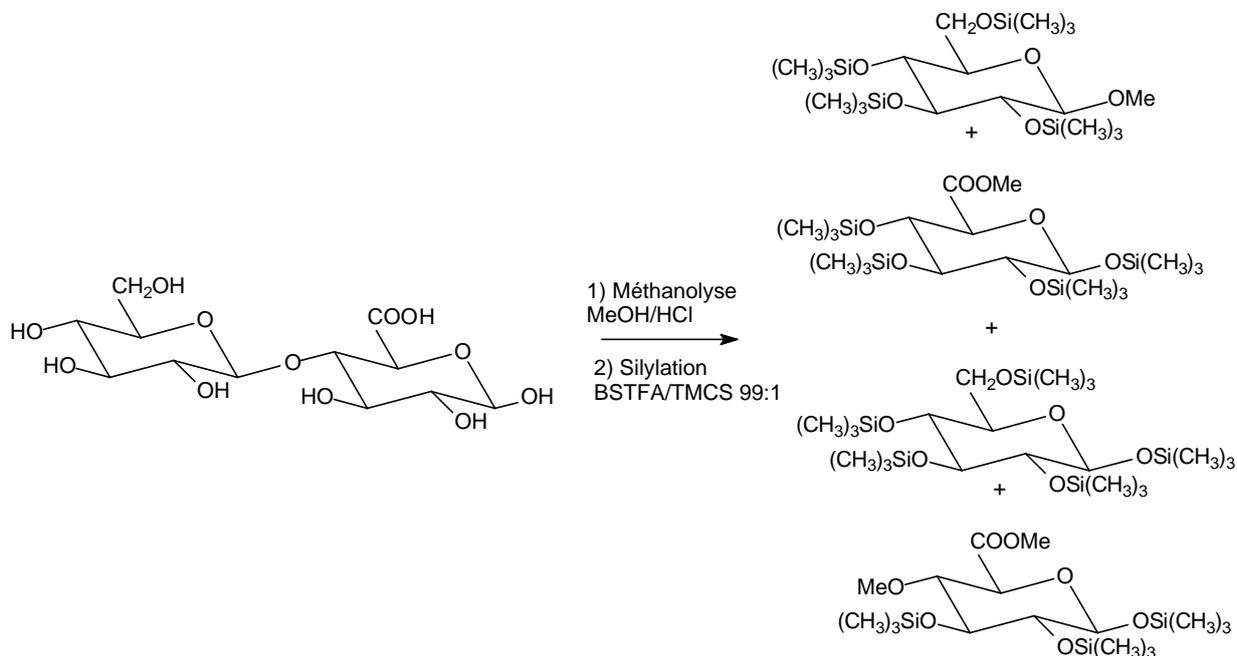


Figure 13 : Méthanolyse et silylation des polysaccharides (exemple d'une unité disaccharidique) pour l'analyse CPG

d) Détermination de la viscosité

Deux techniques ont été utilisées :

- Soit par un viscosimètre rotatif Viscotester GL/R (Haake). Le fonctionnement d'un viscosimètre rotatif est basé sur la résistance à la torsion qu'offre un liquide à la rotation d'une tige de caractéristiques connues, immergée dans ce liquide. Le cylindre ou le disque (tige) giratoire est couplé à un ressort moteur qui tourne à une vitesse déterminée.
- Soit par une mesure approximative et qualitative du temps d'écoulement entre les deux traits d'une pipette jaugée de 10 ml

e) Dosage des métaux

Les dosages des métaux ont été réalisés au Service Central d'Analyses de Vernaison.

4- Résultats et discussions

4.1- Etudes préliminaires

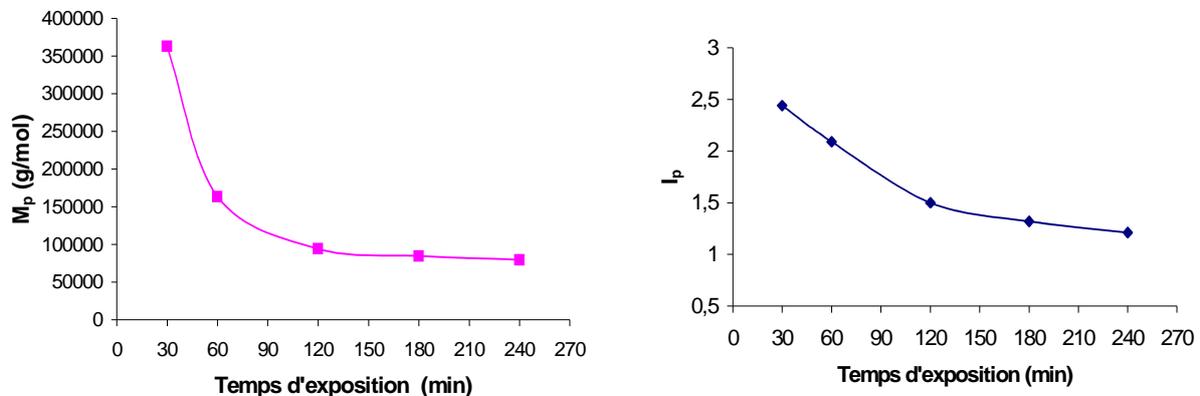
Une première étude concernant la voie de dépolymérisation par les ultrasons avait été réalisée sur les EPS GY 785, HE 800 et MS 907 avant le travail de thèse [45]. L'ensemble des analyses ont été réalisées à l'Ifremer.

a) Etude cinétique

Des études cinétiques ont tout d'abord été menées sur les EPS MS907 et GY785 afin de déterminer les durées d'expositions aux ultrasons à utiliser pour la suite de cette étude.

- Etude sur le MS907 :

Des échantillons d'EPS MS 907 ont été traités par les ultrasons pour différents temps d'exposition. Après traitement, les échantillons ont été analysés par HPSEC, les chromatogrammes obtenus présentaient un seul pic suggérant l'obtention d'un produit assez homogène en taille. Par conséquent, l'évolution de la masse molaire au pic (M_p) ainsi que la polydispersité en masse des produits traités par les ultrasons pour des temps d'exposition croissants a pu être suivie (figures 14). On remarque que la masse et la polydispersité diminuent rapidement pour des temps d'exposition inférieurs à 2 heures, allant respectivement de 10^6 g/mol à 10^5 g/mol et de 3 à 1,5 et qu'au delà de 2 heures un plateau est atteint pour les 2 grandeurs.



Figures 14 : Evolution de la masse molaire au pic et de l'indice de polydispersité en fonction de temps d'exposition aux ultrasons.

La composition osidique globale et la caractérisation des monosaccharides des échantillons traités par 4h d'exposition aux ultrasons ont été déterminées et comparées à celles du produit non traité (tableau 1). Les produits traités et non traités ont des compositions osidiques très proches, ce qui suggère, d'une part, que la méthode de dépolymérisation par ultrasons ne modifie pas la structure du polymère et que, d'autre part, l'unité répétitive de base constitutive de ce polymère, est conservée après traitement par les ultrasons.

	% oses	% acide uronique	% Gal	% Glc	% GalA	% GlcA
MS907	67	45,5	10,6	13,8	3,7	8,7
MS907 non dépolymérisé	60	47,9	8,3	10,5	4,0	9,6

Tableau 1 : Composition osidique du MS 907 avant et après traitement par les ultrasons.

- **Etude sur le GY785 :**

Un autre EPS a été traité par les ultrasons, l'EPS GY 785. Contrairement à ce qui a été observé avec l'EPS MS 907, les chromatogrammes obtenus par analyse HPSEC des EPS GY 785 traités par les ultrasons présentent 3 pics suggérant un produit très hétérogène en taille (figure 15).

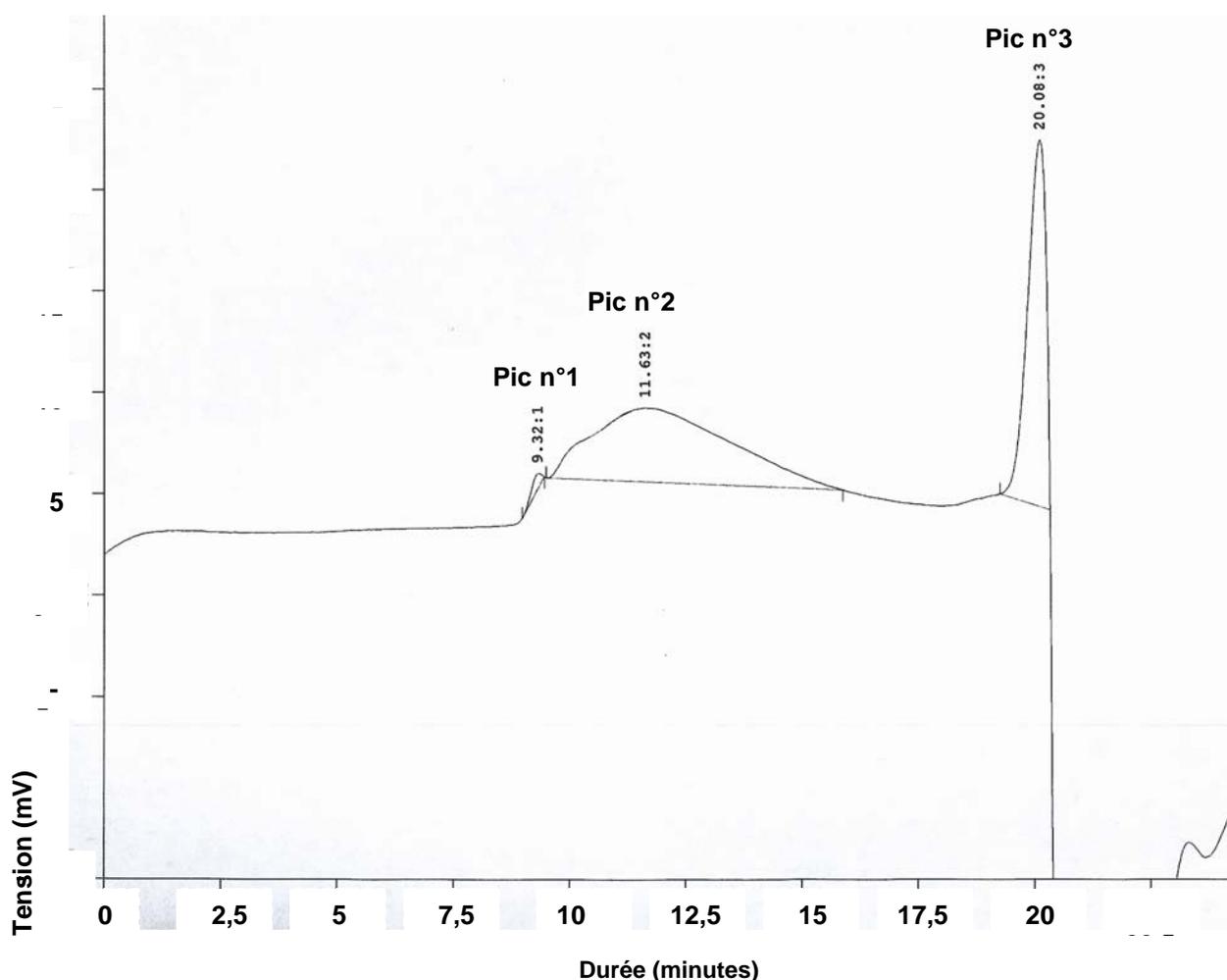


Figure 15 : Analyse HPSEC de l'EPS GY 785 après 60 minutes de dépolymérisation sous ultrasons.

Le premier pic correspond à un pic de très forte masse molaire, il représente 2,1% de l'intégration après 30 min de dépolymérisation et diminue avec la durée d'exposition aux ultrasons pour disparaître complètement après 4h. Le deuxième pic est majoritaire, sa masse molaire diminue de plus de 270 000 g.mol⁻¹ après 30 minutes à un peu plus de 100 000 g.mol⁻¹ après 4 h d'exposition et son pourcentage en intégration passé de 48 % à 71 %. Le troisième pic est un pic de faible masse molaire, de l'ordre de 8000 g.mol⁻¹ qui n'évolue pas avec le temps d'exposition aux ultrasons, seul son pourcentage lors de l'intégration diminue par rapport au deuxième pic passant de 50% de l'intégration après 30 minutes à 30% après 4h.

Le deuxième pic représentant la majorité des chaînes osidiques de l'échantillon traité, la masse molaire au pic de ce pic a été suivie en fonction du temps (figure 16).

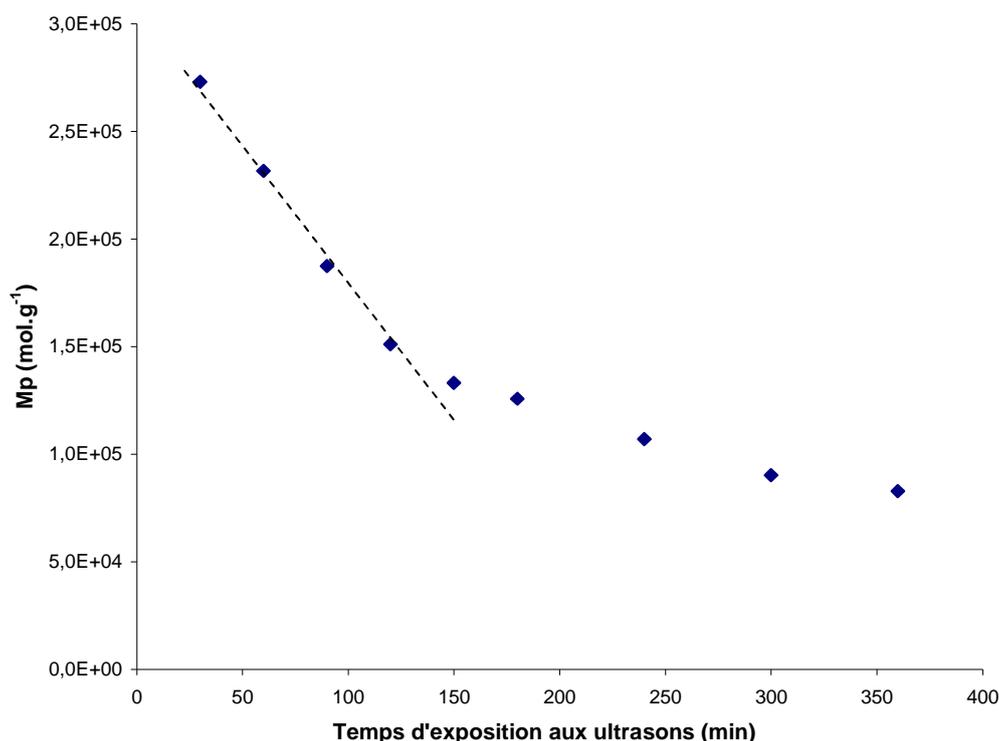


Figure 16 : Evolution de la masse molaire au pic majoritaire (2^{ème} pic) en fonction du temps d'exposition aux ultrasons pour l'EPS GY 785

Cette étude a permis de mettre en évidence que l'équation cinétique de Malhorta [60] était vérifiée au

cours des 150 premières minutes. Pour l'EPS GY 785, l'équation s'écrit : $\frac{1}{M_p} = 3.10^8 t + 2.10^{-6}$

La masse molaire diminue ensuite mais moins rapidement que dans les premières minutes de traitement.

b) Etude de la dépolymérisation par les ultrasons par la méthode des plans d'expérience

Une étude de cinq facteurs a tout d'abord été programmée, pour ne pas réaliser les 32 essais nécessaires en théorie, un plan initial a été construit. Pour le plan initial, deux interactions d'un plan 2³ ont été choisies et aliasées avec les facteurs supplémentaires.

Sur la base d'une étude bibliographique préliminaire, l'importance de certains facteurs dans la dépolymérisation par ultrasons a été mise en valeurs. Il a ainsi été montré que la dépolymérisation était plus efficace dans les premières minutes, et qu'elle était dépendante du volume et de la

puissance de l'irradiation. Cette étude a également fait apparaître l'importance de la température à laquelle se fait l'expérience. Ces paramètres ont été envisagés et nous avons pensé qu'il serait intéressant d'ajouter un aspect novateur à cette étude et cela en ajoutant du peroxyde d'hydrogène qui pourrait permettre la libération de radicaux hydroxyles pouvant favoriser la dépolymérisation.

Le ratio utilisé tout d'abord dans cette étude est de 1 (R=1) : il correspond en fin d'expérience à l'utilisation d'une quantité d'H₂O₂ de 1 g pour 1 g d'EPS traité. Par la suite, différents ratios ont été comparés.

L'influence de ces cinq facteurs a donc été étudiée sur l'EPS HE 800 qui possède une masse initiale M_p de 1,86.10⁶g.mol⁻¹ : le temps, le volume, la durée du pulse, la température et l'ajout d'H₂O₂. Pour chacun de ces facteurs, 2 niveaux ont été choisis.

Facteur	t (h) F1	V (mL) F2	Durée de pulse F3	T (°C) F4	Ajout d'H ₂ O ₂ 35% m/m F5
Niveau -	2	10	2s :2s	30	Sans
Niveau +	4	30	5s :2s	60	R=1

En théorie, 32 essais sont nécessaires. Afin de diminuer le nombre d'expériences à réaliser, un plan fractionnaire 2⁵⁻² a été choisi. Ainsi deux interactions (4 et 5) d'un plan de base 2³ ont été aliasées avec les facteurs supplémentaires.

n° essai	F1	F2	F3	F4	F5	(12) ¹	(23) ²	I _p = $\frac{M_w}{M_n}$	M _p (g.mol ⁻¹)
1	-	-	-	-	+	+	+	3,3	70 400
2	+	-	-	+	-	-	+	2,8	52 400
3	-	+	-	+	+	-	-	1,9	41 300
4	+	+	-	-	-	+	-	1,3	74 200
5	-	-	+	+	-	+	-	1,2	78 600
6	+	-	+	-	+	-	-	1,5	56 300
7	-	+	+	-	-	-	+	1,3	88 400
8	+	+	+	+	+	+	+	2,4	22 900

¹ (12) représente l'interaction entre les facteurs 1 et 2

² (23) représente l'interaction entre les facteurs 2 et 3

Les résultats des calculs de contrastes (explicités en annexe) sont présentés dans le tableau 2 :

Contraste	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I ₇	moyenne
I _p	0,037	-0,237	-0,362	0,112	0,312	0,087	0,487	1,96
M _p	-9131	-3856	981	-11769	-12844	969	-2019	60569

Tableau 2 : Contrastes obtenus pour la masse molaire au pic et l'indice de polydispersité en fonction des différents paramètres étudiés (température, volume, durée de pulse, durée d'exposition, H₂O₂) pour l'EPS HE 800.

Les effets qui paraissent jouer sur la masse molaire et l'indice de polydispersité dans le cas de l'EPS étudié sont différents :

- Masse molaire moyenne :

Un temps plus important, une température plus élevée et l'ajout d'H₂O₂ permettent d'augmenter la dépolymérisation.

- Indice de polydispersité :

Sa valeur augmente pour un volume plus important et par ajout d'H₂O₂ mais diminue avec l'allongement de la durée du pulse. Un plan complémentaire ou au moins une expérience supplémentaire serait nécessaire afin de désaliéser les interactions 23 et 14.

La possibilité d'obtenir des valeurs intermédiaires avec des indices de polydispersité inférieurs à 2 a pu ainsi être mise en évidence.

Il a été choisi pour « conditions types » de réaliser les expériences :

- sur 2h afin de faire le maximum d'expériences tout en sachant qu'une plus grande dépolymérisation pourrait être obtenue en laissant l'échantillon plus longtemps sous irradiations ;
- avec un pulse de 5s toutes les 2s permettant de diminuer le temps d'essai en améliorant apparemment l'indice de dépolymérisation. En effet une durée de pulse 5s : 2s permet d'abaisser le temps de réaction de 4h pour à un pulse de 2s toutes les 2s à 2h48 pour une même durée d'exposition effective aux ultrasons de 2h ;
- de réaliser les expériences sur 10 ml les quantités d'EPS réservées à cette étude étant limitées ;
- à 60 °C, cette température est moins difficile à conserver qu'une température plus basse.

Des analyses chimiques ont été réalisées sur les échantillons les plus intéressants présentant un indice de polydispersité inférieur à 2. L'analyse par chromatographie gazeuse confirme que la dépolymérisation par ultrasons permet bien de garder la composition osidique de l'EPS HE 800, le même profil CPG que celui observé pour l'EPS natif étant obtenu (figure 17).

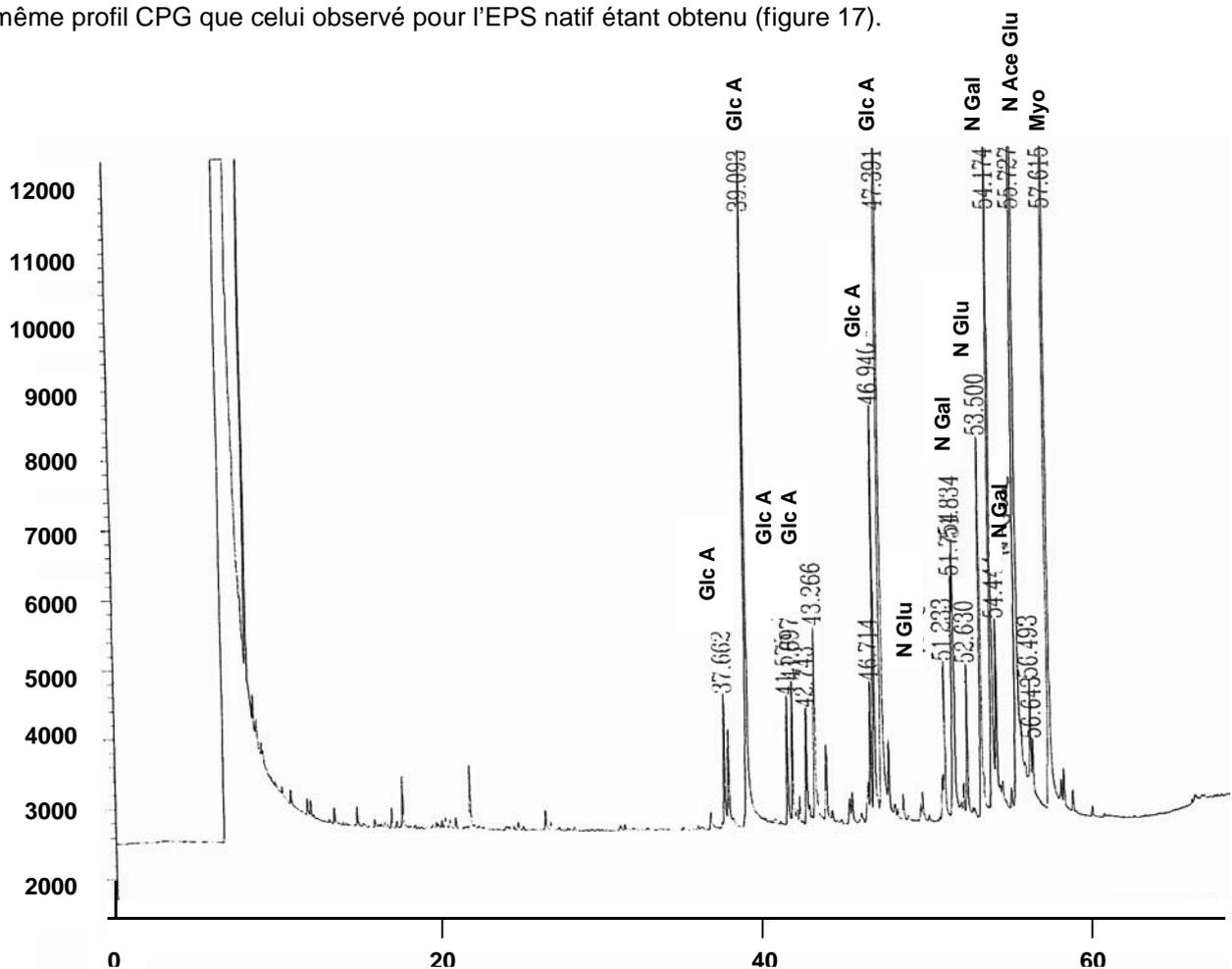


Figure 17 : Profil obtenu par chromatographie gazeuse pour l'EPS HE 800 natif

c) Impact de l'addition du peroxyde d'hydrogène sur la dépolymérisation par les ultrasons

Les études concernant l'addition de peroxyde d'hydrogène en présence d'ultrasons ont été réalisées sur l'EPS MS 907.

- Effets d'une agitation

Même si l'effet du paramètre « agitation » sur la dépolymérisation par ultrasons paraissait improbable puisque les ultrasons sont utilisés pour homogénéiser des solutions, ses effets sur la dépolymérisation n'ont pas été directement écartés.

Les conditions utilisées correspondent aux conditions dites « types ». La quantité d'H₂O₂ ajoutée correspond à un ratio R=1: elle correspond en fin d'expérience à l'utilisation d'une quantité d'H₂O₂ de 1 g pour 1 g d'EPS traité.

Conditions	I _p	M _p
Pas d'H ₂ O ₂	1,7	111 500
Pas d'H ₂ O ₂ + agitation	1,6	116 400
H ₂ O ₂	1,7	26 600
H ₂ O ₂ + agitation	1,6	28 100

Tableau 3 : Masses molaires et indices de polydispersité obtenus en présence ou non de peroxyde d'hydrogène, avec ou sans système d'agitation supplémentaire lors de la dépolymérisation sous ultrasons de l'EPS MS 907.

Comme attendu, tableau 3, l'ajout d'un système d'agitation ne permet pas d'améliorer la dépolymérisation, celle provoquée par les ultrasons se suffisant à elle-même.

- Effets de la température

Trois facteurs ont été étudiés, avec pour chacun, deux niveaux : la température, l'agitation par barreau aimanté et la quantité d'H₂O₂ (tableau 4).

Facteur	T(°C) F1	Agitation F2	H ₂ O ₂ F3
Niveau -	En dessous de 30°C	sans	sans
Niveau +	60°C	barreau aimanté	R=1

Sur les huit essais nécessaires, 4 ont été réalisés : un plan fractionnaire 2³⁻¹ a été utilisé.

n° de l'essai	F1	F2	F3	I _p	M _p (g.mol ⁻¹)
A	-	-	+	1,3	72 300
B	+	-	-	1,5	115 000
C	-	+	-	1,7	113 000
D	+	+	+	1,6	28 100

Tableau 4 : Masses molaires au pic et indices de polydispersité en fonction des différents paramètres étudiés (température, agitation, H₂O₂) lors de la dépolymérisation sous ultrasons de l'EPS MS 907.

L'agitation par barreau aimanté s'étant avérée inefficace, les effets de la température et de la quantité d'H₂O₂ peuvent directement être mesurés.

Pour diminuer notablement la masse molaire M_p, une température de 60°C doit être associée à l'ajout d'H₂O₂. A une température plus basse, l'effet de cet ajout s'avère nul.

En l'absence de peroxyde d'hydrogène, une température plus élevée semble permettre une légère diminution de I_p même si celle-ci reste à confirmer, étant donnée la précision des mesures. L'augmentation de la température n'a, en revanche, dans ce cas, aucun effet sur l'abaissement de la masse molaire.

- Essais sur la quantité ajoutée

Le temps a été fixé arbitrairement à 1h. Trois facteurs ont été étudiés, avec pour chacun, deux niveaux : l'ajout d' H_2O_2 (continu ou pas), la température à laquelle se fait la réaction et la quantité de peroxyde d'hydrogène ajoutée (R=1 et R=0,1).

Facteur	Ajout F1	T (°C) F2	H_2O_2 F3
Niveau -	en 1 fois	20	R=0,1
Niveau +	fractionné	60	R=1

Sur les huit essais nécessaires, 4 ont été réalisés : un plan fractionnaire 2^{3-1} a été utilisé.

n° de l'essai	F1	F2	F3	I_p	M_p (g.mol ⁻¹)
A	-	-	+	2	78 400
B	+	-	-	1,8	81 600
C	-	+	-	1,6	89 600
D	+	+	+	1,3	75 100

Les résultats des calculs de contrastes figurent dans le tableau ci-dessous.

Contraste	I_1	I_2	I_3	moyenne
I_p	- 0,125	- 0,225	-0,025	1,675
M_p	- 2825	1175	- 4425	81 175

Tableau 5 : Contrastes obtenus pour la masse molaire au pic et l'indice de polydispersité en fonction des différents paramètres étudiés (température, ajout d' H_2O_2 en 1 fois ou en continue) pour l'EPS MS 907.

Dans cette étude (tableau 5) la quantité d' H_2O_2 ne semble pas intervenir sur l'indice de polydispersité. Les deux autres facteurs paraissent influents.

On peut noter que par rapport à la première étude les masses molaires obtenues sont beaucoup plus élevées et les différentes valeurs très proches : l'échantillon n'a probablement pas été laissé suffisamment longtemps sous ultrasons.

Le meilleur indice de polydispersité (1,2) et la masse molaire la moins importante sont obtenus pour un ajout fractionné, à 60°C avec la concentration en H_2O_2 la plus importante.

d) Effet d'autres amorceurs de radicaux

Cette étude a été réalisée sur l'EPS MS 907 et concerne l'utilisation d'autres amorceurs de radicaux que le peroxyde d'hydrogène.

Deux concentrations en peroxyde d'hydrogène ont été testées : tout d'abord 0,5 g d' H_2O_2 pour 1 g de l'EPS MS 907 puis un ratio deux fois plus important.

Le mécanisme de dépolymérisation par ajout d' H_2O_2 a jusqu'ici été considéré comme radicalaire. De nombreuses molécules peuvent être la source de radicaux. D'autres amorceurs tels que des peroxydes et l'azo-bis-isobutyronitrile (AIBN) ont été testés, le nombre de moles ajouté correspond à

un ratio massique $R=0,5$. Pour la plupart des amorceurs autres que l' H_2O_2 utilisés, une difficulté a été rencontrée dans la solubilisation : 2 phases sont obtenues.

Les résultats sont présentés dans le tableau 6. L'absence de solubilisation des amorceurs de radicaux autres que l' H_2O_2 dans la solution d'EPS peut expliquer que leurs effets s'avèrent peu significatifs.

Amorceur		I_p	M_p (g.mol ⁻¹)
Absence	Sans	1,7	111 400
Peroxyde d'hydrogène $R=0,5$	H_2O_2	1,2	42 800
Peroxyde d'hydrogène $R=1$	H_2O_2	1,7	26 600
Hydroperoxyde de t-butyle	<i>t</i> -BuO-OH	1,9	125 800
Peroxyde de benzoyle	(PhC(O)O-) ₂	1,5	105300
Azo-bis-isobutyronitrile	(Me ₂ C(CN)-N=) ₂	1,6	97 800

Tableau 6 : Masse molaire au pic et indice de polydispersité obtenus lors de la dépolymérisation par ultrasons en présence de différents amorceurs de radicaux

L'impact de l'ajout d' H_2O_2 lors de la dépolymérisation sous ultrasons semble plus grande dans le cas de l'EPS MS 907 que pour l'EPS HE 800. En effet, l'ajout d'une quantité en peroxyde d'hydrogène de $R=0,5$ permet une diminution de 62 % de la masse molaire de l'EPS MS 907 par rapport à la M_p obtenue en présence d'ultrasons seuls contre une diminution de seulement 20 % dans le cas du HE 800.

A plus forte concentration en H_2O_2 , on observe une augmentation de l' I_p qui est alors égal à celui obtenu sans ajout d' H_2O_2 ($\approx 1,7$).

Des bandelettes analytiques (Merck) ont été utilisées pour mesurer la quantité d' H_2O_2 en fin de réaction : dans les deux cas, celle-ci reste supérieure à 25 mg/L suggérant que cette quantité peut être réajustée par un ajout continu.

Les analyses chimiques montrent qu'en chromatographie gazeuse le même profil que pour l'EPS MS 907 natif est obtenu et ces résultats sont confirmés par l'analyse colorimétrique (tableau 7).

n°	I_p	M_p	% d'oses totaux (g/100g d'EPS)	% d'acides uroniques (g/100g d'EPS)
$R=0,5$	1,20	42788	45,0	33,7
$R=1$	1,67	26603	49,8	39,2
MS 907 non dépolymérisé		$> 10^6$	60,0	47,9

Tableau 7 : Résultats des analyses HPSEC et des dosages colorimétriques obtenus pour la dépolymérisation de l'EPS MS 907 par les ultrasons en présence d' H_2O_2 .

Ces études préliminaires ont montré clairement que cette méthode de dépolymérisation par ultrasons était prometteuse.

Elle permet en effet de diminuer considérablement la masse molaire, d'avoir un indice de polydispersité inférieur à 2 et l'obtention de valeurs intermédiaires. De plus, les analyses chimiques, chromatographie gazeuse et tests colorimétriques, ont permis de vérifier que la composition chimique

par rapport à l'EPS natif n'avait pas changé. L'ajout de peroxyde d'hydrogène associé aux ultrasons permet d'accentuer la dépolymérisation même si les conditions de son ajout restent encore à optimiser.

Cependant, chaque EPS reste un cas particulier : la sensibilité aux ultrasons, la sensibilité à l'ajout de peroxyde d'hydrogène sont différentes. Ceci peut être expliqué par des différences de structure : si le HE800 possède une structure linéaire, le MS907 et le GY785 sont en revanche très ramifiés.

Les conditions utilisées pour la dépolymérisation de chaque exopolysaccharide devront donc être adaptées. L'optimisation des conditions de dépolymérisation à l'EPS HYD 657 a donc fait l'objet de la première partie de la thèse.

4.2- Etude de la dépolymérisation de l'EPS HYD 657 par les ultrasons

Les conditions expérimentales de dépolymérisation devaient être dans un premier temps adaptées puis optimisées à l'EPS HYD 657.

Les échantillons soumis aux ultrasons ont dans un premier temps une concentration de 2g.L^{-1} et un volume de 10 ml fixés arbitrairement lors des études préliminaires. L'EPS est dissous dans de l'eau déminéralisée et la solution est laissée une nuit à température ambiante. Celle-ci est, par la suite, conservée au réfrigérateur.

L'ensemble des analyses a été réalisé à l'Ifremer.

a) Cinétique de la réaction

Une étude cinétique a été réalisée sur le lot 105 C3 (figure 18) entre 15 minutes et 4 heures d'expositions aux ultrasons à 60°C . Les analyses HPSEC n'ont mis en évidence qu'un seul pic : l'échantillon dépolymérisé est donc homogène en taille.

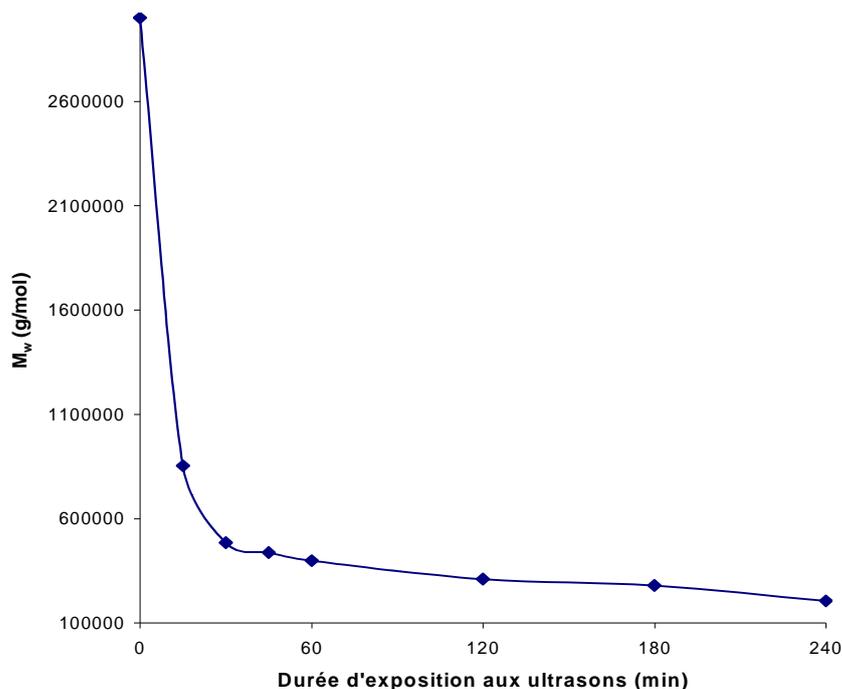


Figure 18 : Evolution de M_w en fonction de la durée d'exposition aux ultrasons

Les résultats de la figure 18 indiquent que la dépolymérisation la plus efficace se produit, comme attendu, dans les premières minutes d'exposition aux ultrasons : après seulement 15 minutes la masse molaire moyenne est divisée par 3,5. Le taux de dépolymérisation approche une asymptote par la suite. Pour l'EPS HYD 657 un plateau, qui dans ces conditions seraient d'environ $120\,000\text{ g.mol}^{-1}$, a été mis en évidence après 10 h d'exposition aux ultrasons. A la fin de la dépolymérisation, la viscosité est alors très proche de celle de l'eau. La durée optimisée pour obtenir le meilleur abaissement de la masse molaire est d'environ 2h.

Le tableau 8 ne montre pas d'évolution de la composition osidique, même après 10 h d'exposition aux ultrasons : aucune altération de celle-ci n'a été observée. Ces analyses semblent vérifier la non sélectivité des ultrasons pour une liaison osidique particulière.

EPS	% Rha	% Fuc	% GlcA	% GalA	% Gal	% Glc	% Man
Natif	3,4	1,8	6,1	7,3	21,7	12,3	1,8
Dépolymérisé sous ultrasons	3,2	1,9	5,5	7,5	22,2	12	1,7

Tableau 8 : Composition osidique de l'EPS HYD 657 avant et après 10 h d'exposition aux ultrasons

b) Durée de pulse

En empêchant une élévation interne de la température dans l'échantillon, la fonction PULSE permet un traitement sur des échantillons sensibles à densité élevée lors du fonctionnement en « batch ». De plus, un temps de repos entre deux pulsations est censé permettre d'améliorer le procédé. La durée des pulsations On et Off peut être réglée indépendamment entre 0,1 et 9 secondes.

Dans les premières expériences, le cycle des pulses a été fixé arbitrairement à deux secondes d'ultrasons toutes les deux secondes, doublant le temps nécessaire à la réalisation d'une manipulation. Le but de cet essai était de vérifier si la durée d'exposition aux ultrasons pouvait être allongée sans diminuer l'efficacité de la dépolymérisation.

Les essais menés sur le lot industriel LCO 105C3 (tableau 9) avec une durée d'exposition aux ultrasons de 2h montrent que la durée de pulse n'aurait pas d'influence sur la dépolymérisation de l'EPS HYD 657.

Durée de pulse	M_p (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	I_p
2s : 2s	201 400	204 500	144 300	2
	194 000	193 000	106 800	1,8
5s : 2s	203 900	220 100	117 600	1,9
	211 800	222 800	110 700	2

Tableau 9 : Evolution des masses molaires et de l'indice de polydispersité en fonction de la durée de pulse

Pour une même durée d'exposition effective aux ultrasons l'allongement du cycle de sonication permet un gain de temps. Ce facteur n'est pas transposable aux montages utilisés à grande échelle: il est propre au fonctionnement en « batch ».

c) Importance de la température de consigne

Dans la littérature [44], de nombreuses études ont montré une plus grande efficacité des ultrasons pour dépolymériser à basse température (5-10°C). L'intérêt de l'abaissement de la température pour l'utilisation des ultrasons seuls devait être vérifié car à une échelle industrielle un système de refroidissement est coûteux. La différence entre un échantillon avec une température de consigne à 30°C nécessitant l'utilisation d'un cryostat et celui où elle est augmentée à 60°C (température obtenue en faisant simplement affleurer sous le réacteur un cristalliseur rempli d'eau) a été évaluée (tableau 10).

T(°C)	M _p (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	M _n (g.mol ⁻¹)	I _p
30	211 900	222 800	110 800	2
60	214 600	232 200	143 400	1,6

Tableau 10 : Evolution des masses molaires et de l'indice de polydispersité en fonction de la température

Un retard de la dépolymérisation dû à une élévation de la température n'a pas été constaté. Une autre expérience a été réalisée à 10°C (le cryostat doit alors être réglé à - 10°C) sans observer d'amélioration de la dépolymérisation.

L'EPS HYD 657 est de très haute masse molaire et possède par conséquent une viscosité élevée à basse température (figure 19). La viscosité est un facteur qui peut expliquer qu'aucune amélioration de la dépolymérisation ne soit observée pour des températures plus basses.

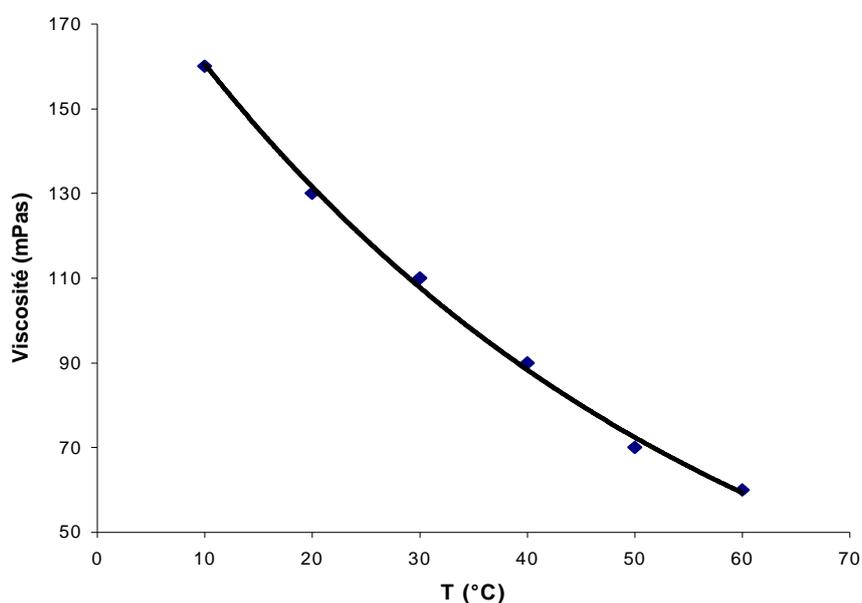


Figure 19 : Evolution de la viscosité en fonction de la température pour une solution d'EPS HYD 657 à 2g.L⁻¹.

d) Effets de la concentration

Les études précédentes ont toutes été réalisées à une concentration arbitrairement fixée à 2g.L⁻¹ (concentration habituellement utilisée à l'Ifremer pour la dépolymérisation par catalyse métallique). L'influence de la concentration sur l'avancée de la dépolymérisation devait être étudiée. La cinétique de la dépolymérisation pour une solution de 10 ml à 3 g.L⁻¹ a été suivie sur 4 heures et comparée à celle qui avait été obtenue pour un échantillon de 10 ml à 2 g.L⁻¹ (figure 20).

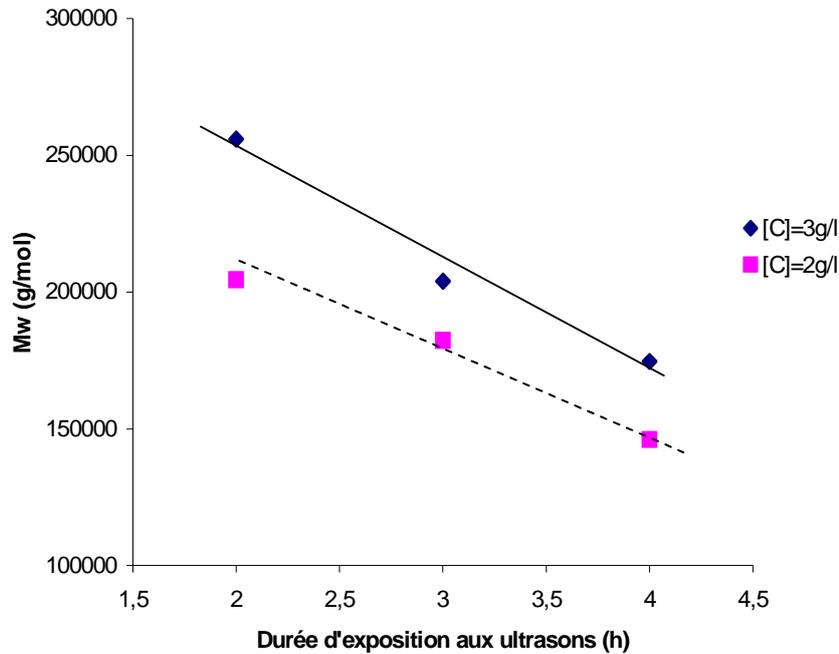


Figure 20 : Cinétique de dépolymérisation de l'HYD 657 pour des concentrations d'HYD 657 de 2 et 3 g.L⁻¹

Dans les mêmes conditions, 3 heures sont nécessaires pour obtenir un échantillon de concentration 3 g.L⁻¹ aussi dépolymérisé que celui obtenu après deux heures d'exposition aux ultrasons pour un échantillon à 2 g.L⁻¹ d'EPS. La plus grande viscosité qui accompagne une augmentation de la concentration (figure 21) peut expliquer en majeure partie le ralentissement de la dépolymérisation. Le phénomène de cavitation est alors plus difficile à obtenir.

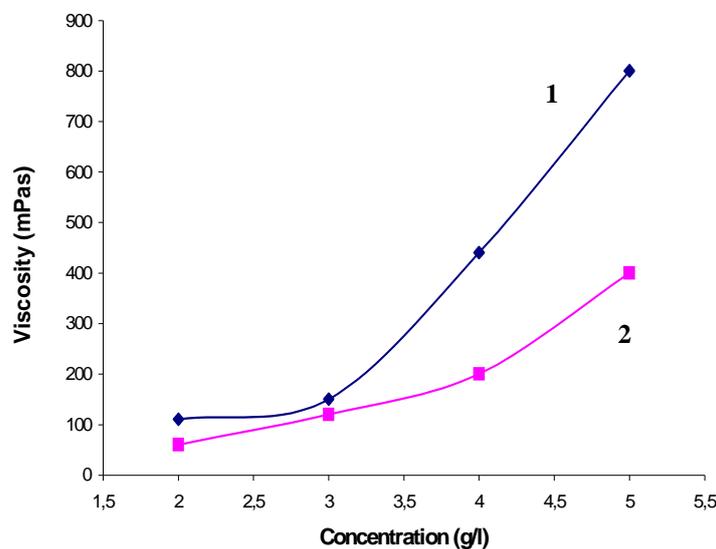


Figure 21 : Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en EPS pour deux températures (1) 30°C et (2) 60°C

Pour une même durée d'exposition, la masse molaire de la fraction obtenue est donc plus importante pour une concentration plus élevée mais cette différence semble s'amoinrir avec le temps. Cette tendance confirme que le fractionnement principal a lieu dans les premières minutes d'exposition pour atteindre par la suite un plateau.

La température qui joue directement sur la viscosité (figure 16) est un facteur important lors d'une augmentation de la concentration. Ainsi il est possible de jouer sur une augmentation de la température pour diminuer la viscosité et pouvoir monter en concentration.

e) Etude de différentes reproductibilités

Les facteurs intervenants lors de la dépolymérisation par ultrasons sont nombreux. L'étude de la reproductibilité des manipulations et des analyses en fonction des lots a permis d'assurer la fiabilité des résultats obtenus. De plus, concernant les analyses HPSEC, des échantillons ont été analysés successivement après quelques heures, après deux mois et/ou après réétalonnage des colonnes, sur deux différentes chaînes HPSEC. Nous avons pu montrer que les résultats collectés pouvaient être comparés, même s'ils n'avaient pas été obtenus dans des conditions d'analyse strictement identiques.

Dans l'objectif d'élargir ces travaux de thèse à d'autres lots industriels, la reproductibilité au niveau de différents lots a également été étudiée. Les toutes premières études avaient été menées sur le lot 00 02 086 LN. Cette comparaison entre 2 lots avait été réalisée avant de connaître les résultats de masses molaires effectués pour l'EPS natif du lot 105C3. A l'œil nu, la dissolution du lot 105C3 paraissait déjà plus difficile, la solution obtenue à 2g/L est encore plus visqueuse. Cette observation a été confirmée par les analyses des études cinétiques (figure 22). La comparaison des cinétiques pour ces deux lots montrent une dépolymérisation plus lente du lot de thèse : après deux heures l'EPS possède une masse molaire au pic de 200 000 g/mol contre 150 000 pour le lot précédemment étudié confirmant l'hypothèse selon laquelle la masse molaire de ce second lot était très probablement encore plus élevée que la masse molaire annoncée pour l'EPS. Ces données ont été confirmées par la suite par les analyses de masses molaires : le lot 105C3 possède une masse molaire deux fois plus élevée que le lot utilisé pour les toutes premières études.

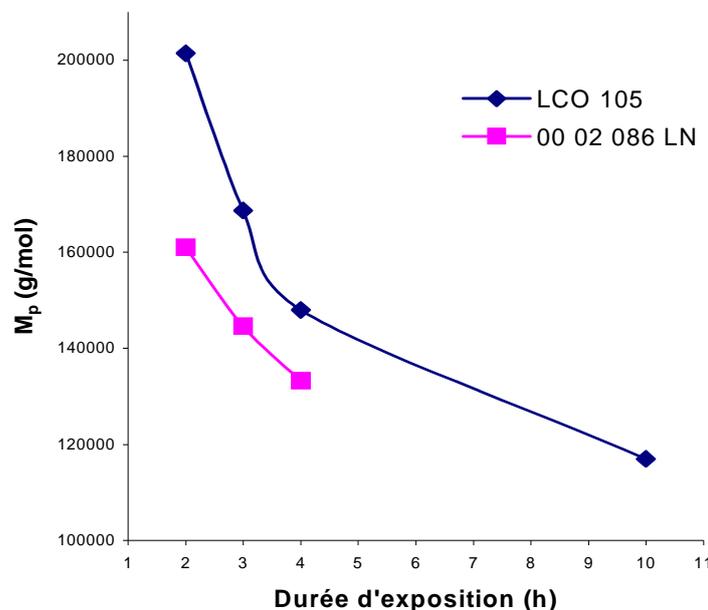


Figure 22 : Cinétique de dépolymérisation pour deux lots d'EPS HYD 657

Lors des premières expériences sur le lot 00 02 086 LN, une étude a été menée (3h, 30°C, pulse de 2s : 2s) concernant l'importance de la solubilisation préalable (tableau 11). La solubilisation

préalable n'apparaissait pas indispensable pour ce premier lot les mêmes masses molaires étaient obtenues avec ou sans celle-ci.

Conditions	M_p (g/mol)	M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	I_p
Sans solubilisation préalable	144 600	148 500	74 500	2,0
Solubilisation préalable	143 000	161 100	95 800	1,7

Tableau 11 : Comparaison des dépolymérisations obtenues avec ou sans solubilisation préalable de l'EPS pour le lot 00 02 086 LN.

Le lot 105 s'est montré plus difficile à solubiliser du fait de sa plus forte masse molaire. Aussi, lorsque la même étude, avec ou sans solubilisation, a été menée sur le lot 105, à l'œil nu on pouvait déjà observer que le mélange après dépolymérisation n'était pas homogène. Celui-ci n'a donc pas été analysé en HPSEC. De plus, lors de différentes études, l'importance de la solubilisation s'est avérée primordiale : lorsque l'échantillon été mal solubilisé avant réaction, deux pics ont été obtenus en fin de dépolymérisation dont un correspondant à l'EPS quasiment pas dépolymérisé. Un soin particulier a donc été apporté à la bonne solubilisation préalable de l'EPS HYD 657.

La masse molaire initiale du lot apparaît donc comme un facteur important pour la reproductibilité des manipulations.

4.3- Synergie peroxyde d'hydrogène et ultrasons pour l'EPS HYD 657

Dans les études préliminaires (4.1) menées sur d'autres EPS, l'ajout d'H₂O₂, combiné aux ultrasons, a permis d'améliorer la dépolymérisation et même de dépasser les plateaux théoriques de dépolymérisation.

La sonolyse de l'eau est un phénomène bien connu qui permet à partir d'eau la production d'hydroxyles et d'atomes d'hydrogènes. Cette réaction peut être suivie par la formation d'H₂O₂. Bien que dans le domaine des basses fréquences dans lesquelles les manipulations ont été réalisées, les effets mécaniques prévalent sur la production de radicaux libres, nous avons essayé d'augmenter la production d'hydroxyles en augmentant la quantité d'H₂O₂. Ainsi, idéalement, chaque H₂O₂ pourrait produire deux hydroxyles et augmenter la dépolymérisation radicalaire sous ultrasons. Par ce mécanisme, nous espérons pouvoir combiner les effets mécaniques et radicalaires des ultrasons.

a) Effet de la température

Une manipulation a été réalisée à deux températures, 10°C et 60°C, pour l'ajout en 1 fois de 25µl H₂O₂ à 35% m/m soit un ratio massique de 0,5 par rapport à l'EPS et une exposition de 2h aux ultrasons.

T de la réaction	Ajout H ₂ O ₂	M_p (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	I_p
15°C	sans	241 300	312 500	79 800	2,1
	R=0,5	235 400	251 000	124 400	2
60°C	sans	201 400	204 500	101 700	2
	R=0,5	114 000	148 000	66 000	2,2

Tableau 12 : Masses molaires obtenues avec ou sans ajout d'H₂O₂ pour des températures de 15 et 60°C.

La dépolymérisation est améliorée à 15°C lors de l'ajout d'H₂O₂ par rapport aux résultats obtenus à cette même température sans ajout (tableau 12). Cependant pour une meilleure dépolymérisation l'ajout doit être combiné à la chaleur apportée par les ultrasons. L'effet de la température sur la viscosité reste un paramètre important pour l'efficacité de la dépolymérisation même lors d'un ajout d'H₂O₂.

b) Conditions de l'ajout

Lors des études préliminaires, l'ajout de peroxyde d'hydrogène a été réalisé en début de réaction ou de manière fractionnée pour une durée d'exposition aux ultrasons fixée arbitrairement à deux heures. Différentes modifications du protocole ont été envisagées: un ajout différé du H₂O₂ après une période préalable d'exposition aux ultrasons, un allongement de la durée d'exposition aux ultrasons après l'ajout du H₂O₂, l'ajout continu du peroxyde d'hydrogène. Ces manipulations ont été réalisées pour deux rapports massiques en H₂O₂ (un rapport de 0,5 et un autre de 1) et pour deux cycles de pulses (un de 2s :2s, l'autre de 5s :2s). Les résultats obtenus figurent dans le tableau 13.

Conditions de l'expérience	Pulse	M _p (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	M _n (g.mol ⁻¹)	I _p
Pas d'ajout : [C] = 2 g.L⁻¹					
2h	2 s : 2s	201 400	204 500	101 700	2
	5 s : 2s	203 900	220 100	117 600	1,9
3h	2s : 2s	160 400	167 300	73 300	2,3
Ajout de R(H₂O₂/EPS) = 0,5					
Ajout en 1 fois en début de réaction 2h d'exposition aux ultrasons	2s : 2s	152 700	163 600	81 800	2
Ajout continu sur 100 min 2h d'exposition aux ultrasons	2s : 2s	102 400	112 700	36 800	3
	5s : 2s	81 500	93 600	31 500	3
Ajout continu sur 100 min 3h d'exposition aux ultrasons	5s : 2s	113 200	112 300	40 500	2,8
Exposition préalable aux ultrasons Ajout sur 100 min 2h d'exposition aux ultrasons	2s : 2s	135 100	139 700	58 100	2,4
	5s : 2s	107 700	113 200	40 400	2,8
Ajout de R(H₂O₂/EPS) = 1					
Ajout en 1 fois en début de réaction 2h d'exposition aux ultrasons	2s : 2s	78 400	88 700	32 700	2,7
Ajout continu sur 100 min 2h d'exposition aux ultrasons	2s : 2s	108 000	122 300	100 300	1,2
	5s : 2s	115 300	127 700	53 500	2,4
Ajout continu sur 100 min 3h d'exposition aux ultrasons	2s : 2s	59 400	79 000	27 100	2,9
	5s : 2s	81 000	90 800	39 100	2,3
Exposition préalable aux ultrasons Ajout sur 100 min 2h d'exposition aux ultrasons	5s : 2s	80 900	92 700	39 800	2,3

Tableau 13 : Déterminations des masses molaires et de l'indice de polydispersité de l'EPS HYD 657 en fonction des conditions d'ajout pour des ratios massiques 0,5 et 1 en peroxyde d'hydrogène.

L'ajout continu d' H_2O_2 semble un facteur important. En effet, il permet d'améliorer la dépolymérisation : ainsi, pour $R=0,5$, la masse molaire est abaissée de 160 000 pour un ajout de H_2O_2 réalisé en 1 fois à 110 000 g/mol pour un ajout continu. S'il y a formation de radicaux, l'ajout continu doit permettre la formation au fur et à mesure des radicaux responsables de la dépolymérisation. L'allongement de la durée d'exposition aux ultrasons lors de l'ajout d' H_2O_2 n'a, par contre, pas permis d'améliorer la dépolymérisation.

Si l'ajout d' H_2O_2 permet d'améliorer la dépolymérisation en divisant la masse molaire par deux par rapport à 2 h d'exposition aux ultrasons seuls, un palier semble encore atteint pour $100\ 000\ g.mol^{-1}$.

Le ratio de 1 en H_2O_2 n'a pas réellement permis d'améliorer plus la dépolymérisation, des M_w voisines ont été observées. De plus, ce ratio plus important serait, probablement, plus propice aux phénomènes de dégradation.

Des analyses supplémentaires ont été réalisées sur le lot de thèse de l'EPS HYD 657 par le service central d'analyses de Vernaison. Les quantités de métal initialement présentes dans l'EPS (tableau 14) sont trop faibles pour envisager qu'une réaction de type Fenton catalyse la dépolymérisation.

Métal analysé	Fe ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	Mg %	Na %	Ca %
Quantités	110	12	95	15	1,75	1,19	1,61

Tableau 14 : Dosage d'éléments réalisés sur le lot industriel 105 C3 de l'HYD 657

4.4- Recherche d'autres synergies

Si l'ajout d' H_2O_2 est celui qui a retenu toute notre attention, d'autres synergies ont été recherchées. Ainsi, l'ajout d'acide ascorbique, de NaOCl ou encore de métaux a également été évalué.

a) Ajout d'acide ascorbique

Des essais ont été réalisés afin d'améliorer les résultats obtenus en présence d' H_2O_2 par l'ajout d'acide ascorbique (entre 1 et 10% en masse par rapport à l'EPS) sur la base de publications parues en dépolymérisation par catalyse métallique [61,62].

En l'absence d'eau oxygénée les résultats de dépolymérisation n'ont pas été améliorés par cet ajout.

Par contre, en présence d' H_2O_2 , des masses molaires en masses inférieures à 10 000 g/mol ont été obtenues de façon reproductible. Les échantillons se sont révélés instables dans le temps même lorsqu'une dialyse était réalisée après dépolymérisation afin d'éliminer l'excès d'acide ascorbique. Une étape supplémentaire de réduction aurait été très probablement nécessaire pour stabiliser les échantillons. Ces étapes supplémentaires de purifications enlevant aux ultrasons leur aspect de méthode propre de dépolymérisation, l'ajout d'acide ascorbique n'a pas été approfondi.

b) Ajout d'hypochlorite de sodium

Une comparaison des résultats obtenus par la synergie H_2O_2 /ultrasons avec ceux obtenus en présence d'hypochlorite de sodium [60] semblait intéressante. La dépolymérisation en présence de

NaOCl s'est révélée plus efficace avec des fractions de masses molaires maximum d'environ 50 000 g/mol obtenues pour un ratio massique de 0,5 NaOCl/EPS après 2h d'exposition aux ultrasons dans les conditions types. Par contre, elle s'est montrée plus difficile à contrôler :

- Une dépolymérisation importante est observée même en l'absence d'exposition aux ultrasons (pour la fraction la plus lourde $M_w = 490\ 000$ g :mol pour un ratio massique de 0,5);
- Trois massifs (figure 23) sont cette fois-ci obtenus faisant plus penser à des phénomènes de dégradation qu'à une dépolymérisation « propre » comme celle observée précédemment.

La présence de produits secondaires nécessitant là encore une étape de purification supplémentaire par rapport à l'utilisation des ultrasons seuls ou avec ajout d' H_2O_2 , cet ajout n'a pas été approfondi.

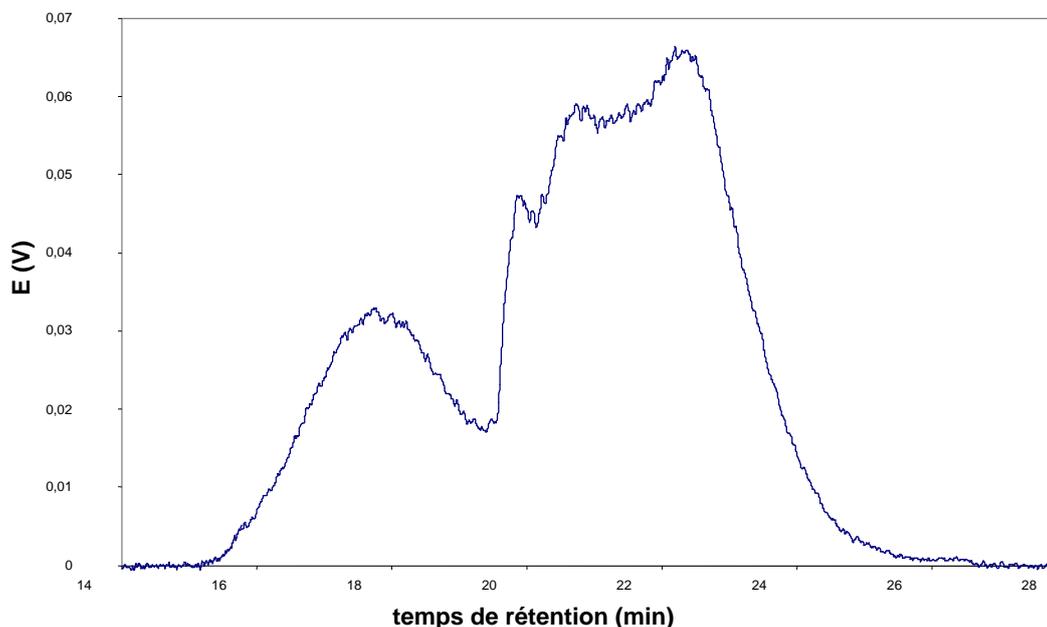


Figure 23 : Profil HPSEC obtenu après dépolymérisation par les ultrasons lors de l'ajout de NaOCl.

c) Ajout de métaux

Du peroxyde d'hydrogène peut être formé en petites quantités à partir de l'eau par recombinaison des radicaux hydroxyles et des hydrogènes pendant l'exposition aux ultrasons. La quantité d' H_2O_2 produite peut permettre, si elle est assez importante et en présence d'un métal de transition, une dépolymérisation radicalaire par un mécanisme de type Fenton.

Une série d'expériences a été réalisée dans les conditions types avec ajout de quantités en métaux égales à celles utilisées dans les conditions de la dépolymérisation par catalyse métallique. Les résultats de cette étude figurent dans le tableau 15. Lors de l'ajout d'acétate de cuivre, une diminution de la masse molaire moyenne en masse, qui a été divisée par 2, a été observée et ceci de façon reproductible accompagnée d'une augmentation de l'indice de polydispersité par rapport à l'utilisation des ultrasons seuls. Par contre l'ajout de zinc n'a pas permis une telle amélioration. Nous reviendrons plus en détails sur l'importance du choix du métal dans la seconde partie de ce mémoire.

Ajout	M _p (g.mol ⁻¹)	M _w (g.mol ⁻¹)	M _n (g.mol ⁻¹)	I _p
sans	201 400	204 500	101 700	2
Acétate de cuivre (0,2%)	72 500	100 700	27 500	3,7
Sulfate de zinc (0,2%)	231 600	223 500	124 500	1,8

Tableau 15 : Evolution de la dépolymérisation par ultrasons après 2h d'exposition en présence de métaux

EPS	% Rha	% Fuc	% GlcA	% GalA	% Gal	% Glc	% Man
Natif	3,4	1,8	6,1	7,3	21,7	12,3	1,8
Dépolymérisé sous ultrasons	3,2	1,9	5,5	7,5	22,2	12	1,7
Dépolymérisé sous ultrasons en présence de cuivre	nd	0,8	6,8	5,5	11,8	6,4	1

Tableau 16 : Composition osidique de l'EPS après dépolymérisation sous ultrasons avec ajout de métal

Si la dépolymérisation est améliorée par l'ajout de cuivre de la même façon que lors de l'ajout d'H₂O₂, l'EPS se trouve par contre pollué par cet ajout. L'obtention d'un échantillon propre demande des étapes supplémentaires d'ultrafiltration et de passages sur résines chélatantes.

De plus, les analyses CPG (tableau 16) ont montré des modifications importantes dans la composition osidique (les quantités en galactose et en glucose ont, par exemple, été divisées par 2), qui n'avaient pas été observées lors des précédentes dépolymérisation sous ultrasons. La dépolymérisation réalisée en présence de métal apparaît donc moins respectueuse de la composition initiale et donc moins « propre ». Néanmoins la synergie entre l'ajout de cuivre et les ultrasons pourrait être d'intérêt dans l'optique de travaux futurs.

Les résultats obtenus lors de ces différents ajouts ont semblé moins intéressants que l'ajout d'H₂O₂ puisqu'ils nécessitent des étapes supplémentaires de purification.

4.5- Manipulations préliminaires d'extension d'échelle

Les résultats présentés jusqu'à présent concernent la microsonde conique ultrahaute intensité adaptée à de petits volumes (inférieurs à 10 ml). D'autres études ont été réalisées afin d'établir si ces résultats pouvaient être transposés à une plus grande échelle (250 ml au maximum) à l'aide de la sonde haute intensité, toujours dans le cadre du laboratoire.

a) Conception d'un réacteur

Les volumes de 200-250 ml envisagés ont nécessité la réalisation d'un réacteur (figure 24) permettant :

- une régulation facile de la température grâce à une double enveloppe;
- d'éviter les pertes de produit par projection grâce à une hauteur suffisante ;
- d'envisager une circulation par flux continu permettant de se rapprocher de conditions plus industrialisables.

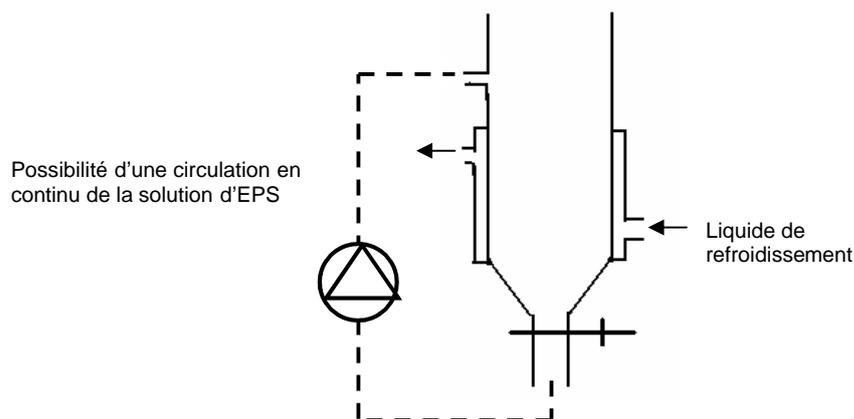


Figure 24 : Design du réacteur utilisé pour des volumes de 200-250 ml.

b) Résultats obtenus sans ajout

Le nouveau réacteur permet de travailler sur des volumes plus importants mais la sonde utilisée possède une intensité plus faible. Pour pallier à cette différence d'intensité, le temps d'exposition aux ultrasons doit être allongé (tableau 17). Des rendements massiques supérieurs à 90% ont été observés.

EPS		M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	M_p (g.mol ⁻¹)	I_p
Natif (2g/L)		3 010 020	762 150	2 355 590	3,95
10 ml sonde ultra haute intensité	après 3h	160 400	67 300	73 300	2,3
	après 10h	125 300	78 000	149 500	1,9
200 ml sonde haute intensité	après 3h	239 140	112 140	214 680	2,1
	après 10h	105 300	38 700	94 800	2,7

Tableau 17 : Comparaison des masses molaires et indices de polydispersité obtenus après exposition aux ultrasons pour des volumes différents d'une solution d'EPS à 2 g/L .

Après 3h d'exposition aux ultrasons une moins bonne dépolymérisation est obtenue pour le volume le plus important. Après 10 h d'exposition aux ultrasons, la différence est inexistante, le même plateau est atteint pour $M_w \sim 105\ 000$ g.mol⁻¹.

c) Résultats obtenus avec ajout de H₂O₂

Des essais de dépolymérisation avec la combinaison ultrasons et H₂O₂ ont été réalisés pour des ratios massiques de 0,5 et de 1 en H₂O₂. Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus précédemment pour une solution de 10 ml à 2g/L d'EPS (tableau 18).

Les résultats obtenus pour 200 ml sont proches de ceux qui ont été obtenus sur 10 ml :

- l'ajout de peroxyde d'hydrogène permet de diviser par deux la masse molaire moyenne en masse par rapport à celle qui est obtenue avec les ultrasons seuls ;
- L'ajout d'un ratio plus important ne permet pas d'améliorer la dépolymérisation ;
- La même valeur finale de dépolymérisation est observée avec une M_w d'environ 115 000 g.mol⁻¹.

EPS		M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	M_p (g.mol ⁻¹)	I_p
Native		3 010 020	762 150	2 355 590	3,95
10 ml	2h ultrasons	204 500	101 700	201 400	2
	2h ultrasons, R = 0,5	112 700	36 800	102 400	3
	2h ultrasons, R = 1	127 700	53 500	115 300	2,4
200 ml	3h ultrasons	239 140	112 140	214 680	2,1
	3h ultrasons, R = 0,5	118 770	41 220	91 860	2,9
	3h ultrasons, R = 1	145 650	43 530	118 160	3,3

Tableau 18 : Comparaison des masses molaires et indices de polydispersité obtenus après exposition aux ultrasons combinée à l'ajout d'H₂O₂ pour des volumes différents d'une solution d'EPS à 2 g/L .

D'autres expériences ont été réalisées, toujours sur 200 ml d'une solution d'EPS HYD 657 à 2g/L, avec ajout de catalase en fin de réaction afin d'éliminer l'excès d'H₂O₂. Les résultats des analyses HPSEC sont présentés dans le tableau 19.

Conditions	M_p (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	M_n (g.mol ⁻¹)	I_p
Sans ajout	253 400	303 000	118 700	2,6
R=0,5	96 750	120 340	37 240	3,2
R=0,5+catalase	110 800	122 500	38 350	3,2
R=1	83 000	101 100	33 600	3
R=1+catalase	110 800	146 700	48 700	3

Tableau 19 : Comparaison des masses molaires et indices de polydispersité obtenus après exposition aux ultrasons combinée à l'ajout de différents ratios en H₂O₂ avec élimination ou non de l'H₂O₂ résiduel par de la catalase.

Des témoins ont été utilisés afin de s'assurer que l'amélioration de la dépolymérisation n'était pas l'unique fait d'une dégradation par H₂O₂ qui se produirait également en l'absence d'ultrasons.

Aucune dégradation de l'échantillon au cours du temps en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène n'a été relevée: les mêmes résultats sont obtenus que l'excès d'H₂O₂ soit éliminé ou non par présence de catalase en fin de réaction. De plus, les résultats des analyses des échantillons un an, puis 2 ans après, ne montrent aucune évolution dans le temps. L'écart dans l'amélioration de la dépolymérisation entre un ajout d'un rapport de 0,5 ou de 1 en H₂O₂ est faible.

Les analyses CPG (tableau 20) n'ont montré aucune modification dans la composition osidique de l'EPS HYD 657 dépolymérisé sous ultrasons en présence d'H₂O₂. La dépolymérisation se fait toujours de manière non sélective.

EPS	% Rha	% Fuc	% GlcA	% GalA	% Gal	% Glc	% Man
Natif	3,4	1,8	6,1	7,3	21,7	12,3	1,8
US + H ₂ O ₂	2,9	1,4	8,2	6,6	19,3	11,5	1,6

Tableau 20 : Composition osidique de l'EPS HYD 657 après 2h d'exposition aux ultrasons en présence d' H₂O₂.

4.6- Premier changement d'échelle

Le passage à un petit pilote à basses fréquences a été réalisé par Nicolas GONDREXON du Laboratoire d'Electrochimie et de Physico-chimie des Matériaux et des Interfaces (UMR 5631 / CNRS - INPG - UJF / Equipe de Génie des Procédés, Saint Martin d'Hères).

a) Technologie hautes fréquences

Dans la littérature, le domaine des basses fréquences dans lequel les expériences ont été réalisées jusqu'à maintenant est préconisé pour la dépolymérisation [42]. Il est apparu intéressant de vérifier s'il était également possible de dépolymériser l'EPS HYD 657 dans les hautes fréquences. Un essai a donc été réalisé à Grenoble sur un litre de solution d'EPS à 2 g/l.

Le fonctionnement en « batch pur » de la sonde haute fréquence avec laquelle l'expérience a été réalisée est similaire à celui utilisé en basses fréquences au laboratoire.

Pendant la manipulation, un suivi analytique qualitatif de la viscosité par mesure du temps d'écoulement a été réalisé pour permettre de suivre l'évolution de la dépolymérisation.

Ces mesures qualitatives ont été complétées d'une analyse chromatographique permettant de suivre l'évolution de M_w en fonction du temps de traitement (figure 25).

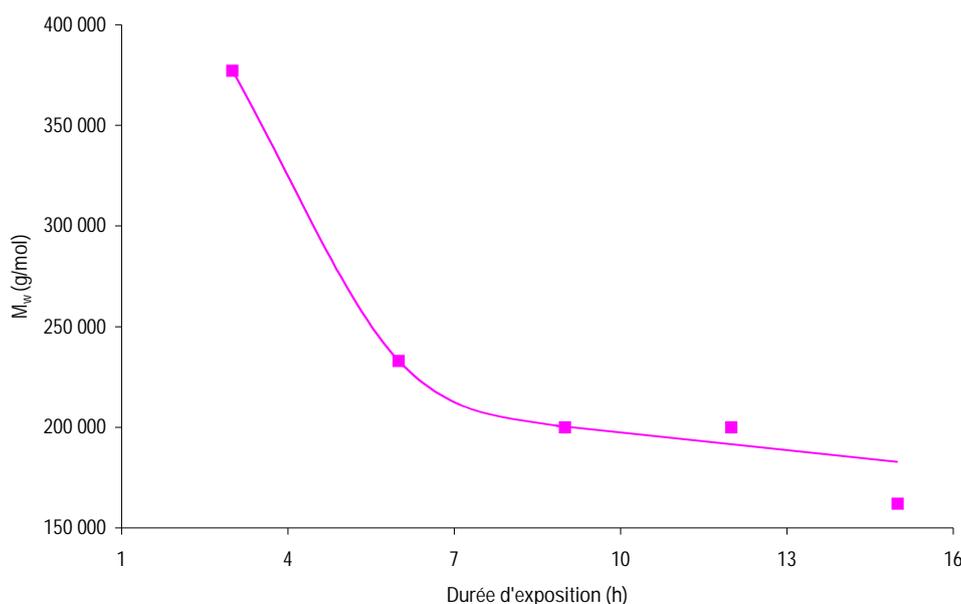


Figure 25 : Evolution de la masse molaire moyenne en masse en fonction de la durée d'exposition aux ultrasons pour un essai en hautes fréquences

L'EPS HYD 657 a pu être dépolymérisé en hautes fréquences. La durée d'exposition aux ultrasons nécessaire pour obtenir les mêmes résultats que ceux obtenus à l'échelle du laboratoire est trois fois supérieure. Néanmoins il est à noter que le volume utilisé était beaucoup plus important que ceux précédemment étudiés.

Des analyses chimiques ont été réalisées sur l'échantillon final après 15 heures d'exposition aux ultrasons (tableau 21). Les analyses par CPG révèlent une modification de la composition osidique de l'EPS HYD 657 qui n'avait pas été observée en basses fréquences avec une diminution des glucoses et des galactoses. Ces modifications se rapprochent de celles mises en évidence en dépolymérisation

radicalaire par catalyse métallique où une modification au niveau de la composition en glucose et en galactose a également été observée (Partie 2 du mémoire).

En analysant de plus près les résultats, nous observons que :

$$\frac{\%Gal}{\%Glc}(\text{natif}) \approx \frac{\%Gal}{\%Glc}(\text{dépolymérisé}) \approx 1,8$$

La galactose et le glucose évoluent donc de la même façon pendant la dépolymérisation. Cette observation pourrait indiquer une rupture sélective d'une liaison Gal-Glc. Par contre, aucune liaison de ce type ne figure dans l'hypothèse de structure de l'HYD 657. A notre niveau de connaissance de la structure, nous ne pouvons donc conclure que sur une rupture du polysaccharide semblant être privilégiée au niveau des glucoses et des galactoses.

EPS	% Rha	% Fuc	% GlcA	% GalA	% Gal	% Glc	% Man
Natif	3,4	1,8	6,1	7,3	21,7	12,3	1,8
Dépolymérisé en HF	3,5	1,8	5,7	7,6	17,3	9,5	1,7

Tableau 21 : Composition osidique de l'EPS HYD 657 après 15 h d'exposition aux ultrasons hautes fréquences.

b) Technologie basses fréquences

Ce premier essai sur un volume plus important de 9 litres a été réalisé sans optimisation. Le fonctionnement en pseudo-batch qui a été retenu, fait appel à une boucle de recirculation. Cette boucle permet un exposition en continu, et non plus par pulses, aux ultrasons en évitant un échauffement trop important de l'échantillon.

Des cinétiques de dépolymérisation concernant l'évolution de la viscosité et de la masse molaire ont été réalisées (Figure 26). L'étude de l'évolution de la viscosité en fonction de la durée d'exposition aux ultrasons permet de vérifier la corrélation directe existant avec la diminution de la masse molaire. On remarque que M_w , après une décroissance rapide, tend à se stabiliser vers une valeur limite d'environ $250\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ un peu plus élevée que celle précédemment observée à l'échelle du laboratoire ($200\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Ce premier essai de dépolymérisation peut être considéré comme très encourageant : l'expérience a été menée à une échelle de volume totalement différente, avec un appareillage très différent et ceci sans aucune optimisation. Pour des volumes certes différents, les résultats de dépolymérisation sont proches de ceux qui avaient été obtenus en hautes fréquences. Les analyses chimiques (tableau 22) réalisées sur un échantillon final ne révèlent aucune modification de la composition glycosidique même après 15h d'expositions aux ultrasons.

EPS	% Rha	% Fuc	% GlcA	% GalA	% Gal	% Glc	% Man
Natif	3,4	1,8	6,1	7,3	21,7	12,3	1,8
Dépolymérisé en BF	3,1	1,8	5,3	7,7	24,5	12,8	1,8

Tableau 22 : Composition osidique de l'EPS HYD 657 après 15 h d'exposition aux ultrasons basses fréquences

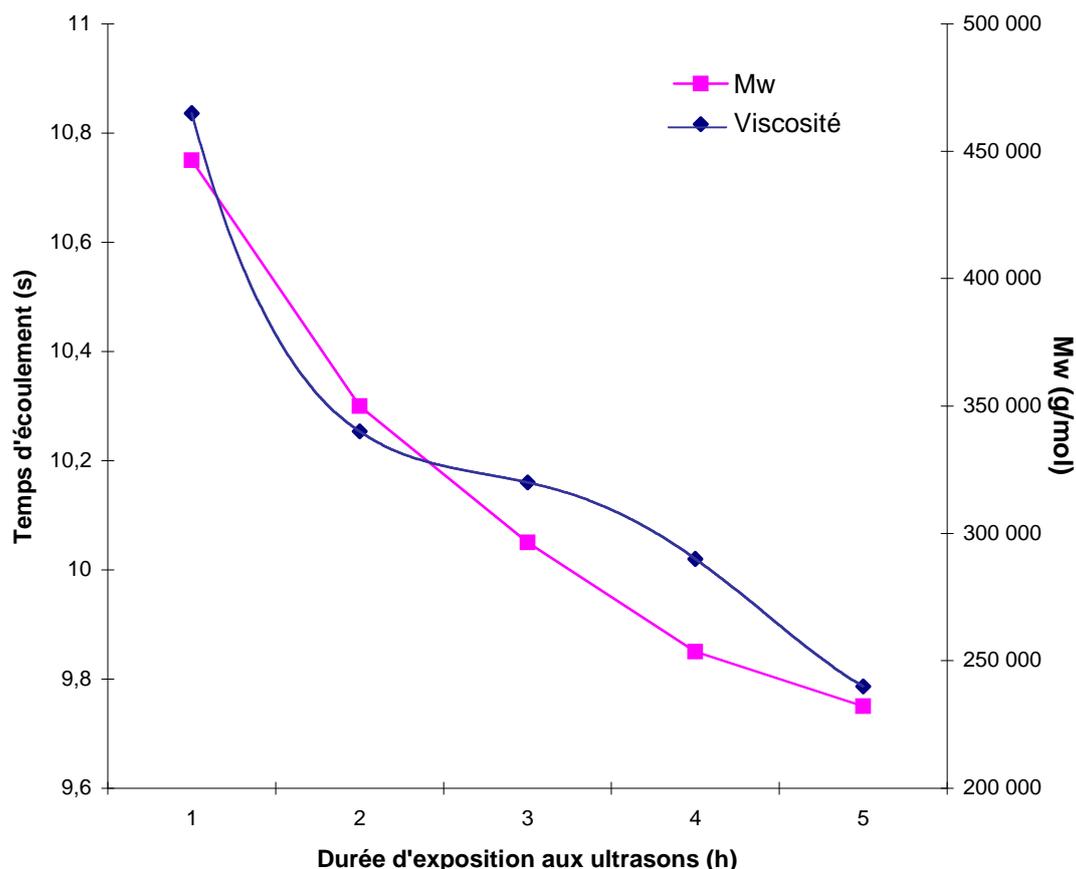


Figure 26 : Evolution de la masse molaire moyenne en masse déterminée par HPSEC et de la viscosité en fonction de la durée d'exposition aux ultrasons pour un essai en basses fréquences

c) Bilan de l'extension d'échelle

Cette première série d'essais, dont il faut rappeler qu'ils n'ont pas été optimisés, a permis de montrer que la technologie ultrasonore, selon les deux déclinaisons employées ici, semblait tout à fait pertinente pour conduire à une dépolymérisation effective du produit mis en solution à plus grande échelle. Avant de conclure que les résultats obtenus sont similaires quelle que soit la technologie utilisée, comme semblent l'attester les valeurs de M_w , il convient de rappeler que ces technologies ont opéré à des échelles de volume différent. Cette dernière observation est particulièrement importante dans la perspective de développer un tel procédé. Ceci étant, ces premiers résultats augurent de perspectives intéressantes pour une application industrielle.

5- Conclusions et perspectives

Parmi les différentes techniques physiques de dépolymérisation, il est apparu intéressant de travailler plus particulièrement sur les effets de l'irradiation ultrasonique sur l'EPS HYD 657. Cette approche avait fait préalablement l'objet d'un premier travail de recherches durant lequel différents EPS avaient alors été dépolymérisés. Ces premiers travaux fort encourageants, ont été poursuivis et approfondis. La reproductibilité des ultrasons a été vérifiée pour l'ensemble des manipulations puisque celles-ci étaient au minimum doublées. Les paramètres les plus pertinents, concentration, température et durée d'exposition aux ultrasons, ont pu être adaptés à l'EPS HYD 657. L'ajout d' H_2O_2 a

permis d'améliorer l'efficacité de la dépolymérisation en combinant les dépolymérisations par voies chimique et physique, toujours sans modification apparente de la distribution en sucres. Une première étude d'extension d'échelle a permis de vérifier la faisabilité du process à une échelle toute autre que celle du laboratoire. Une étude plus exhaustive permettrait une extrapolation directe à une plus grande échelle. Trois techniques ultrasons pourraient être testées (basse fréquence, haute fréquence et une fréquence intermédiaire) sur des volumes de 10 litres minimum (le réservoir utilisé possède une capacité de 50 L) et différentes configurations des systèmes pourraient être envisagées afin de trouver le montage le plus adéquate. Une viscosité proche de celle de l'eau étant obtenue après quelques heures sous ultrasons il serait possible de charger au fur et à mesure l'échantillon pour monter en concentration (avec un système de boucle, par exemple), si la durée de la manipulation n'est pas un facteur rédhibitoire. Cependant le problème de la concentration de l'échantillon en fin de manipulation reste posé, des procédés membranaires pourraient, par exemple, être envisagés. L'amélioration de la dépolymérisation par ajout d' H_2O_2 doit également être validée à plus grande échelle.

Caractérisation des oligosaccharides par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC)

La masse molaire des EPS est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC). Les échantillons analysés ont, sauf exceptions, une concentration de 2 g.L⁻¹ et sont préalablement filtrés sur seringue. Selon les études, les analyses ont été réalisées sur deux chaînes HPSEC.

- **Première chaîne HPSEC :**

La colonne est une SuperdexTM200 (Amersham Pharmacia Biotech) qui est utilisée pour la séparation des protéines, peptides, polynucléotides et autres biomolécules par filtration sur gel. Le gel est composé de dextrane et d'agarose. Son domaine de fractionnement total utile est compris entre 20 000 et 100 000 g/mol. Les échantillons sont analysés avec un débit de 0,5 ml/min d'un tampon acétate d'ammonium (0,1 N) dans un système HPLC Kontron. La calibration de la colonne est réalisée avec des standards de dextrane et de pullulane (Interchim) de masse molaire comprise entre 300 et 400 000 g.mol⁻¹. La détection en sortie de colonne est réalisée par réfractométrie avec un réfractomètre ERC 7512 (ERMA INC). Les mesures de surfaces et les calculs de M_w , M_n , M_p et I_p sont réalisés par la suite avec le logiciel ARAMIS (JMBS developpements, Le Fontanil, France).

- **Deuxième chaîne HPSEC :**

La colonne est une PL-Aquagel OH mixte (Polymer Laboratories) qui est utilisée pour la séparation d'une grande variété de polymères naturels ou synthétiques solubles dans l'eau. Le gel est composé d'un copolymère macroporeux possédant des fonctions polyhydroxyles hydrophiles. Son domaine de fractionnement total utile théorique est compris entre 100 et 10⁷ g.mol⁻¹. Les échantillons sont analysés avec un débit de 0,5 ml/min d'un tampon acétate d'ammonium (0,1 N) sur une chaîne HPLC Thermo Separation. La calibration de la colonne est réalisée avec des standards de pullulane (Interchim) de masse molaire comprise entre 300 et 400 000 g.mol⁻¹. La détection en sortie de colonne est réalisée par un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL 31 (Eurosep) relié à un compresseur assurant une pression de 3 bars. Le gain du photomultiplicateur, déterminant la sensibilité de l'analyse, est fixé à 650 mV. La température du nébulisateur est fixée à 75°C. Les mesures de surfaces et les calculs de M_w , M_n , M_p et I_p sont réalisés par la suite à l'aide de feuilles de calcul Excel.

Une ligne de base est alors calculée. Les standards de pullulanes permettant de relier le temps de rétention avec la masse M_i en chaque point. La connaissance de la hauteur du signal H_i et de la masse en chaque point permettent de déterminer les différentes masses moyennes grâce aux formules suivantes :

$$M_n = \frac{\sum H_i}{\sum \frac{H_i}{M_i}} \qquad M_w = \frac{\sum H_i M_i}{\sum H_i} \qquad I = \frac{M_w}{M_n}$$

Détermination de la teneur en oses totaux

- **Préparation des réactifs :**

Solution d'orcinol :

0,2g d'orcinol (3,5-dihydroxytoluène) est dissous dans 100 ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique à 95-97 %. Cette solution est stockée à 4°C à l'obscurité. Le délai de péremption est d'une semaine.

- **Préparation de l'échantillon:**

Une solution mère à 2 mg/ml est préparée. Trois dilutions sont réalisées : 10 µl, 20 µl et 30 µl dans 200 µl d'eau.

- **Hydrolyse et développement de la coloration :**

Dans des tubes à essai placés dans un bain de glace sont introduits 200 µl de la solution à doser et 1 ml de la solution d'orcinol.

Les tubes sont agités au vortex puis maintenus pendant 15 minutes dans un bain marie à 80°C. Les tubes sont refroidis à l'eau courante puis placés 45 minutes à l'obscurité afin de développer et stabiliser la couleur brun-orangé.

L'absorbance de chacune des solutions est déterminée à 510 nm.

La quantification se fait par rapport à une gamme étalon obtenue à partir d'une solution mère de glucose à 2 mg/ml.

Les acides uroniques donnent une coloration avec le réactif. Cette interférence nécessite donc l'introduction d'un terme de correction.

Dosage des acides uroniques

- **Préparation des réactifs :**

1) Solution de tétraborate de sodium à 0,075 M

2,86 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 100 ml d'acide sulfurique à 95-97 %

2) Solution d'acide sulfamique/potassium sulfamate 4 M pH 1,6

38,8 g d'acide sulfamique sont dissous dans 50 ml d'eau osmosée. L'acide est dissous pas l'addition goutte à goutte d'une solution saturée en KOH. Le pH est ajusté à 1,6 et le volume est ensuite réajusté à 100 ml.

3) Solution aqueuse de 3-hydroxybiphényl à 0.15 % (w/v)

15 mg de 3-hydroxybiphényl à 0,5% est dissous dans une solution de NaOH à 0,5%

4) Solution d'acide glucuronique à 500 $\mu\text{g/ml}$

25 mg d'acide glucuronique sont dissous dans 50 ml d'eau osmosée

- **Préparation de l'échantillon:**

Une solution mère à 2 mg/ml est préparée. Trois dilutions sont réalisées : 40 μl , 80 μl et 120 μl dans 400 μl d'eau (1/10, 1/5 et 1/3).

- **Hydrolyse et développement de la coloration :**

Dans des tubes à essai placés dans de la glace pilée, sont introduits dans l'ordre 400 μl de la solution à doser, 40 μl de la solution d'acide sulfamique/potassium sulfamate 4M et 2,4 ml de la solution, de tétraborate de sodium 0,075 M. Le mélange est agité après chaque addition.

Les tubes sont chauffés pendant 20 minutes dans un bain-marie à 80°C puis refroidis à température ambiante sous l'eau courante.

80 μl de la solution de 3-hydroxybiphényl sont ajoutés et le mélange est «vortexé» fortement.

La coloration est laissée à évoluer pendant 10 minutes.

L'absorbance est lue à 525 nm.

La quantification se fait par rapport à une gamme étalon obtenue à partir d'une solution standard d'acide glucuronique à 500 $\mu\text{g/ml}$.

Analyse des dérivés glycosidiques par chromatographie en phase gazeuse

- **Matériel chromatographique :**

L'injection de composés dérivés des résidus glycosidiques est réalisée sur un chromatographe HP avec passeur automatique, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-Sil-5CB (Chrompack). La pression du gaz vecteur constitué (hélium) est de 100 kPa et la température du détecteur est de 300°C.

- **Protocole :**

A 200 µg de polysaccharide lyophilisés en présence de 20 µg de *myo*-inositol utilisé comme étalon interne sont ajoutés 500 µl de MeOH/HCl 2N. Les tubes sont hermétiquement fermés puis sont placés dans un bain à sec réglé à 100°C pendant 4 heures.

Après refroidissement du méthanolysat, le pH est ajusté à 6-7 à l'aide de carbonate d'argent. Les osamines éventuellement présentes sont alors *N*-acétylées par l'addition de 50 µl d'anhydride acétique. Après une nuit à l'obscurité, le chlorure d'argent est éliminé par centrifugation (3000 tr/mn, 5 mn), puis le surnageant est ramené à sec sous jet d'azote.

Les méthylglycosides sont triméthylsilylés dans 50 µl de pyridine avec l'ajout de 50 µl de Sylon BFT (Bis-(triméthylsilyl)trifluoroacetamide :triméthylchlorosilane, 99 :1), à température ambiante pendant 2 heures. Après évaporation sous jet d'azote des réactifs en excès, les méthylglycosides triméthylsilylés sont repris dans 500 µl de dichlorométhane. Ils sont ensuite identifiés par chromatographie en phase gazeuse à l'aide du programme suivant de montée en température du four : 50°C maintenus pendant 1 mn, puis un gradient de 20°C/mn jusqu'à 120°C, suivi d'un gradient de 2°C/mn jusqu'à 240°C.

Annexe : Plans d'expériences

Dans cette annexe figure le détails des calculs réalisés pour chaque type de plan fractionnaire utilisé du paragraphe 4.1 intitulé « études préliminaires »

• **Mise en place de conditions types**

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressés à l'influence de 5 facteurs : le temps (F1), le volume (F2), la durée du pulse (F3), la température (F4) et l'ajout d'H₂O₂ (F5). Pour chacun de ces facteurs, 2 niveaux ont été choisis :

Facteur	t (h) F1	V (mL) F2	Durée de pulse F3	T (°C) F4	Ajout d'H ₂ O ₂ 35% m/m F5
Niveau -	2	10	2s :2s	30	Sans
Niveau +	4	30	5s :2s	60	R'

Le plan complet pour l'étude de 5 facteurs prévoit 32 essais et fournit les 32 effets. Nous avons tenté de conclure l'étude en 8 essais seulement sachant que, si cela avait été nécessaire, un plan complémentaire pouvait être réalisé. La matrice des effets d'un plan 2³ a donc été utilisée.

Pour que les résultats d'un plan fractionnaire puissent être interprétés, il faut que les effets intéressants soient aliasés (confondus) avec des interactions négligeables.

Ce choix implique la construction d'une matrice des essais :

n° essai	F1	F2	F3	F4	F5
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	+	-
3	-	+	-	+	+
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-
6	+	-	+	-	+
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+

Il exige ensuite de définir les aliasés du plan.

Des générateurs d'aliasés indépendants ont été choisis:

$$\left. \begin{array}{l} F4 = F1.F2.F3 \quad \rightarrow I = F1.F2.F3.F4 \\ F5 = F1.F3 \quad \quad \rightarrow I = F1.F3.F5 \end{array} \right\} \text{Où I représente la moyenne}$$

La matrice des effets s'écrit :

n° essai	1 F1	2 F2	3 F3	4 F4 F1.F2.F3	5 F5 F1.F2	6 F1.F3	7 F2.F3	8 I
1	-	-	-	-	+	+	+	+
2	+	-	-	+	-	-	+	+
3	-	+	-	+	+	-	-	+
4	+	+	-	-	-	+	-	+
5	-	-	+	+	-	+	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-	+
7	-	+	+	-	-	-	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

PARTIE 1 : Etude d'une voie physique de dépolymérisation : Les ultrasons

Dans la matrice des effets, les colonnes dédiées aux interaction s'obtiennent en effectuant le produit ligne à ligne des colonnes des facteurs concernés.

Les générateurs d'alias permettent de retrouver les regroupements des effets dans toutes les colonnes de la matrice. Deux générateurs d'alias indépendants ont été définis précédemment. Les générateurs d'alias dépendants sont obtenus par multiplication des générateurs indépendants 2 à 2, 3 à 3... Dans cette étude il n'y a qu'un seul générateur dépendant :

$$I = (F1.F2.F3.F4).(F1.F3.F5) = F3.F4.F5$$

La colonne 1 contient l'effet de F1. Pour obtenir la signification complète de cette colonne, il faut multiplier par F1 tous les générateurs d'alias. Nous obtenons :

$$F1(I) = F1 (F1.F2.F3.F4) = F1 (F1.F3.F5) = F1 (F3.F4.F5)$$

$$\text{Soit } F1 = F2.F3.F4 = F3.F5 = F1.F3.F4.F5$$

Dans la première colonne, le contraste s'écrit donc par ordre d'interaction croissant :

$$I_1 = F1 + F3.F5 + F2.F3.F4 + F1.F2.F4.F5 \approx F1 + F3.F5$$

De même, pour les autres colonnes :

$$I_2 = F2 + F4.F5 + F1.F3.F4 + F1.F2.F3.F5 \approx F2 + F4.F5$$

$$I_3 = F3 + F1.F5 + F1.F2.F4 + F2.F3.F4.F5 \approx F3 + F1.F5$$

$$I_4 = F4 + F2.F5 + F1.F2.F3 + F1.F3.F4.F5 \approx F4 + F2.F5$$

$$I_5 = F5 + F1.F3 + F2.F4 + F1.F2.F3.F4.F5 \approx F5 + F1.F3$$

$$I_{12} = F1.F2 + F3.F4 + F1.F4.F5 + F2.F3.F5 \approx F1.F2 + F3.F4$$

$$I_{23} = F2.F3 + F1.F4 + F1.F2.F5 + F3.F4.F5 \approx F2.F3 + F1.F4$$

$$I_8 = \text{Moyenne} + F1.F3.F5 + F2.F4.F5 + F1.F2.F3.F4 \approx \text{Moyenne}$$

Nous avons fait l'hypothèse que les interactions d'ordre supérieures à 2 sont négligeables.

Résultats des 8 expériences :

n° essai	1 F1+ F3.F5	2 F2 + F4.F5	3 F3 + F1.F5	4 F4+ F2.F5	5 F5 + F1.F3	6 F1.F2 + F3.F4	7 F2.F3 + F1.F4	8 Moy.	$I_p = \frac{M_w}{M_n}$	M_p (g.mol ⁻¹)
1	-	-	-	-	+	+	+	+	3,3	70 450
2	+	-	-	+	-	-	+	+	2,8	52 400
3	-	+	-	+	+	-	-	+	1,9	41 300
4	+	+	-	-	-	+	-	+	1,3	74 200
5	-	-	+	+	-	+	-	+	1,2	78 600
6	+	-	+	-	+	-	-	+	1,5	56 250
7	-	+	+	-	-	-	+	+	1,3	88 450
8	+	+	+	+	+	+	+	+	2,4	22 900

Calcul de l'effet moyen de 1 pour la masse molaire :

$$I_1 = 1/8 (-70450 + 52400 - 41300 + 74200 - 78600 + 56250 - 88450 + 22900)$$

$$I_1 \approx -9131$$

Le même procédé a été utilisé pour les autres facteurs.

Contraste	I_1	I_2	I_3	I_4	I_5	I_6	I_7	moyenne
I_p	0,037	-0,237	-0,362	0,112	0,312	0,087	0,487	1,96
M_p	-9131	-3856	981	-11769	-12844	969	-2019	60569

Dans le cas de la masse molaire, les résultats les plus significatifs sont obtenus pour les contrastes 1,4 et 5. Les contrastes 2, 3 et 6 et 7 pouvant être négligés à côté, toutes les ambiguïtés liées aux interactions sont levées et un plan complémentaire n'a pas été nécessaire.

• **Conditions d'ajout du peroxyde d'hydrogène :**

Nous avons choisi dans cette étude de nous intéresser à l'influence de 3 facteurs : l'ajout d'H₂O₂ (continu ou pas), la température à laquelle se fait la réaction et la quantité d'H₂O₂ ajoutée. Pour chacun de ses facteurs deux niveaux ont été choisis :

Facteur	Ajout F1	T (°C) F2	H ₂ O ₂ F3
Niveau -	en 1 fois	20	50 µL 3,5% m/m
Niveau +	Fractionné	60	50 µL 35% m/m

Sur les huit essais nécessaires, 4 ont été réalisés : un plan fractionnaire 2³⁻¹ a été utilisé. La matrice des essais s'écrit :

n° de l'essai	F1	F2	F3 F1.F2
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Le générateur d'alias indépendant qui a été choisi est: F3 = F1.F2 → I = F1.F2.F3

La colonne 1 contient l'effet de F1. Pour obtenir la signification complète de cette colonne, il faut multiplier par F1 tout le générateur d'aliase. Nous obtenons :

$$F1(I) = F1 (F1.F2.F3)$$

$$\text{Soit } F1 = F2.F3$$

Dans la première colonne, le contraste s'écrit donc : I₁ = F1 + F2.F3

De même, pour les autres colonnes : I₂ = F2 + F1.F3 et I₃ = F3 + F1.F2

Résultats des 4 expériences :

n° de l'essai	1 F1 + F2.F3	2 F2 + F1.F3	3 F3 + F1.F2	4 Moyenne
1	-	-	+	+
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	+	+

I _p	M _p (g.mol ⁻¹)
2	78 400
1,8	81 600
1,6	89 600
1,3	75 100

Calcul de l'effet moyen de 1 pour la masse molaire:

$$I_1 = 1/4 (- 78 400 + 81 600 - 89600 + 75100)$$

$$I_1 \sim - 2825$$

Le calcul des autres facteurs a été réalisé par le même procédé :

Contraste	I ₁	I ₂	I ₃	moyenne
I _p	- 0,125	- 0,225	-0,025	1,675
M _p	- 2825	1175	- 4425	81 175

- 1- Rellve L., Nagasawa N., Luan L.Q., Yagi T., Aranilla C., Abad L., Kume T., Yoshii F., Dela Rosa A. (2005). Degradation of carrageenan by radiation. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 403-410.
- 2- Von Sonntag C. (1987). *The chemical basis of radiation biology*. Taylor and Francis, London.
- 3- Hammer N.I., Shin J.W., Headrick J.M., Diken E.G., Roscioli J.R., Weddle G.H., Johnson M.A. (2004). How do small water clusters bind an excess electron?. *Science*, 306, 675-679.
- 4- Charleby A. (1995) *Advanced Radiation Chemistry Research : Current Status*. In IAEA-TECDOC-834, Vienna, 151.
- 5- Bisio A, Guglieri S., Frigerio M., Torri G., Vismara E., Cornelli U., Bensi D., Gonella S., De Ambrosi L. (2004). Controlled gamma-ray irradiation of heparin generates oligosaccharides enriched in highly sulfated sequences. *Carbohydrate Polymers*, 55(1), 101-112.
- 6- De Ambrosi L., Recchia W., Ferrari G. (1991). Process for the controlled preparation of low molecular weight glucosaminoglycans. Brevet US4987222. 1991-01-22.
- 7- Ito M. (2003). Method of producing low molecular weight chitin/chitosan and method of producing an osteoconduction substance. Brevet US2003078394. 2003-04-24.
- 8- Aoki, S., Kobayashi N., Kume T., Okuaki A. (1977). Low-viscosity starch. Brevet JP52128244. 1977-10-27.
- 9- Bogdanovitch B., Senioukov V., Koroliov A., Simonov K. (1999). *Proceedings of particle accelerator conference*. New York, 2570.
- 10- Liu L.Z., Priou C. (2003). Molecular weight reduction of polysaccharides by electron beams. PCT Int. Appl., 39 pp. WO 2004000885.
- 11- Pawlowski A., Svenson S.B. (1999). Electron beam fragmentation of bacterial polysaccharides as a method of producing oligosaccharides for the preparation of conjugate vaccines. *FEMS Microbiology Letters*, 174(2), 255-263.
- 12- De Ambrosi L., Gonella S., Bensi D., Torri G., Bisio A. and Vismara E. (2005). Multistep process for the physical depolymerization of heparin and products obtained therefrom. Brevet EP1524276. 2005-04-20.
- 13- Khan K. A.; Farooq R., Iqbal M.N. (1985). Chemical effects of UV radiation on aqueous solutions of heparin-Ca salt. *Polymer Photochemistry*, 6(6), 465-474.
- 14- Shibata Y. (2004). Method for producing low molecular weight glycosaminoglycan by ultraviolet ray irradiation and enzymic hydrolysis. Brevet US2004167243. 2004-08-26.
- 15- De Ambrosi L., Lannacone N., Gonella S., Vismara E., Nesti S., Torri G. (2003). Radiation process for the physical depolymerization of glycosaminoglycans and products obtained therefrom. Brevet EP1475391. 2003-12-31.
- 16- Sato M., Myamoto K. (2000) Ultraviolet irradiation apparatus and production of photocrosslinked glucosaminoglycan. Brevet JP2000126589. 2000-05-09.
- 17- Tomasick P., Zaranyika M.F. Non conventional methods on modification of starch. *In Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. London: Academic Press, 243-320.
- 18- Bertolini A.C., Mestres C., Colonna P., Raffi, J. (2000). Free radical formation in UV- and gamma-irradiated cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 44(3), 269-271.
- 19- Sriburi P., Hill S. E., Barclay F. (1999). Depolymerization of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 38(3), 211-218.

- 20- Akhlaq M. S., Schuchmann H.P., Von Sonntag C. (1990). Degradation of the polysaccharide alginic acid: a comparison of the effects of UV light and ozone. *Environmental Science and Technology*, 24(3), 379-383.
- 21- Khan A.R., Johnson J.A., Robinson R.J. (1979). Degradation Of Starch Polymers By Microwave Energy. *Cereal Chemistry*, 59, 303-304.
- 22- Yu H.M., Chen S.T., Suree P., Nuansri R., Wang K.T. (1996). Effect of Microwave Irradiation on Acid-Catalyzed Hydrolysis of Starch. *Journal of Organic Chemistry*, 61(26), 9608-9609.
- 23- Singh V., Sethi R., Tewari A., Srivastava V., Sanghi R. (2003). Hydrolysis of plant seed gums by microwave irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 523-525.
- 24- Zhou G., Sun Y., Xin H., Zhang Y., Li Z., Xu Z. (2004). In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research*, 50(1), 47-53.
- 25- Reddy T.T., Tammishetti S. (2004). Free radical degradation of guar gum. *Polymer Degradation and Stability*, 86(3), 455-459.
- 26- Kunlan L., Lixin X., Jun L., Jun P., Guoying C., Zuwei, X. (2001) Salt-assisted acid hydrolysis of starch to D-glucose under microwave irradiation. *Carbohydrate Research*, 331(1), 9-12.
- 27- Richards W.T., Loomis A.L. (1927). The chemical effects of high frequency sound waves I. A preliminary Survey. *The Journal of the American Chemical Society*, 49(12). 3086-3100.
- 28- Mason T.J., Lorimer J.P. (1988). *Sonochemistry, theory, application and uses of ultrasound in chemistry*. Chichester, UK: Ellis Horwood.
- 29- Luche J.L. (1994) La sonochimie : quelques principes et applications en chimie des corps gras. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 1(1), 69-74.
- 30- Pestman J.M., Engberts J.B.F.N., de Jong F. (1994). Sonochemistry: theory and applications. *Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas*, 113, 533-542.
- 31- Flint E.B., Suslick K.S. (1990). On the origin of sonoluminescence and sonochemistry, *Ultrasonics*, 28(5), 280-290.
- 32- Lepoint T., Mullie F. (1994). What exactly is cavitation chemistry? *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(1), S13-S22.
- 33- Marguilis M.A. (1992). Fundamental aspects of sonochemistry, *Ultrasonics*, 30(3), 152-155.
- 34- Ando T., Sumi S., Kawate T., Ichihara J., Hanafusa T. (1984). Sonochemical switching of reaction pathways in solid-liquid two-phase reactions. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 7, 439-440.
- 35- Einhorn C., Einhorn J., Dickens M.J., Luche J.L. (1990). Organic sonochemistry. Some illustrative examples of a new fundamental approach. *Tetrahedron Letters*, 31(29), 4129-4130.
- 36- Petrier C., Micolle M., Merling G., Luche J.L., Reverdy G. (1992). Characteristics of pentachlorophenate degradation in aqueous solution by means of ultrasound. *Environmental Science & Technology*, 26(8), 1639-1642.
- 37- Mason T.J. (1990). Ultrasound in Polymer Chemistry. In: *Sonochemistry: the uses of ultrasound in chemistry*, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.
- 38- Flosdorf E.W., Chambers L.A. (1933). The chemical action of audible sound. *Journal of the American Chemical Society*, 55(7), 3051-3052.

- 39- Henglein A., Gutierrez M. (1990). Chemical effects of continuous and pulsed ultrasound: a comparative study of polymer degradation and iodide oxidation. *Journal of physical chemistry*, 94(12), 5169-5172.
- 40- Henglein A., Gutierrez M. (1988). Sonolysis of polymers in aqueous solution. New observations on pyrolysis and mechanical degradation. *Journal of physical chemistry*, 94(12), 3705-3707.
- 41- Price G.J. (1990). The use of ultrasound for the controlled degradation of polymer solutions. In: *Advances in sonochemistry* vol.1. Masson, T.J. (eds), JAI Press, Greenwich, 213-287.
- 42- Portenlanger G., Heusinger H. (1997). The influence of frequency on the mechanical and radical effects for the ultrasonic degradation of dextrans. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, 127-130.
- 43- Basedow A.M., Ebert K.H. (1975). Determination of molecular weight distributions and mean molecular-weight values of clinical dextrans, *Infusionstherapie Und Klinische Ernährung*, 2(4), 261-265.
- 44- Lorimer J.P. , Mason T.J. , Cuthbert T.C., Brookfield E.A. (1995). Effect of ultrasound on the degradation of aqueous native dextran. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(1), S55-S57.
- 45- Petit A.C. (2002). Etude d'une nouvelle voie de dépolymérisation des exopolysaccharides, rapport de stage de 3^{ème} année, ENSCR.
- 46- Raguénès G., Peres A., Ruimy R., Pignet P., R Christen R., Loaec M., Rougeaux H., Barbier G., Guezennec J. (1997a). *Alteromonas infernus* sp.nov, a new polysaccharide producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Bacteriology*, 82, 422-430.
- 47- Roger O., Kervarec N., Ratiskol J., Collic-Jouault S., Chevolut L. (2004). Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Research*, 339(14), 2371-2380.
- 48- Raguénès G., Christen R., Guezennec J., Pignet P., Barbier G. (1997b). *Vibrio diabolicus* sp.nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International journal of systematic bacteriology*, 47, 989-995.
- 49- Rougeaux H., Kervarec N., Pichon R., Guezennec J. (1999). Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research*, 322(1), 40-45.
- 50- Raguénès G., Cambon-Bonavita M-A., Lhier J-F., Boisset C., Guezennec J. (2003) A novel, highly viscous polysaccharide excreted by an *alteromonas* isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Current Microbiology*, 46, 448-452.
- 51- Sado G., Sado M.C. (1992). Les plans d'expériences De l'expérimentation à l'assurance qualité. Afnor collection: "afnor technique", Bayeux, France.
- 52- Goupy J. (1998). La méthode des plans d'expériences. Dunod (Eds), France.
- 53- Dubin P.L. (1994). Nonionic polysaccharides as calibration standards for aqueous size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 25(4), 295-303.
- 54- Nardella A., Chaubet F., Boisson-Vidal C., Blondin C., Durand P., Jozefonvicz J. (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*, 289, 201-208.
- 55- Rimington C. (1931). The carbohydrate complex of serum proteins. II: Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from protein of blood *Biochemical Journal*, 25, 1062-1071.

- 56- Blumenkrantz N., Asboe- Hansen G. (1973). New methode for quantitative determination of uronic acids, *Analytical Biochemistry*, 54, 484-489.
- 57- Tullia M., Filisetti-Cozzi C., Carpita N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.
- 58- Kamerling J.P., Gerwig G.J., Vliegebhart J.F., Clamp J.R. (1975). Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides, *Biochemical Journal*, 151, 491-495.
- 59- Montreuil, J. , Bouquelet S., Debray H. , Fournet B., Spik G., Stecker G. (1986). Glycoproteins. In: *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Oxford University Press, New York, 143-204.
- 60- Basedow A.M., Ebert K.H. (1975). Determination of molecular weight distributions and mean molecular-weight values of clinical dextrans, *Infusionstherapie Und Klinische Ernährung*, 2(4), 261-265.
- 61- Niedermier W., Dobson C., Radford P. (1967). Studies on the ascorbic acid-induced depolymerization of hyaluronic acid. *Biochimica and Biophysica Acta*, 141, 366-373.
- 62- Herp A., Rickards G, Matsumura L.B (1967). Depolymerization of some polysaccharides and synthetic polymers by -ascorbic acid. *Carbohydrate Research*, 4(1), 63-71.
- 63- Hawkins C.L., Davies M.J. (1998). Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono-saccharides, and models compounds by hypochlorite: Evidence for radical intermediates and fragmentation. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1396-1410.

PARTIE 2 : Etude de deux voies chimiques de dépolymérisation : la catalyse métallique et l'électrochimie

1- Les voies chimiques de dépolymérisation

Les voies chimiques de dépolymérisation des polysaccharides sont nombreuses. Elles sont étudiées depuis plus d'une centaine d'années et ont fait l'objet de nombreuses publications. Nous nous sommes intéressés aux voies les plus connues et les plus facilement transposables à l'échelle industrielle, c'est à dire celles réalisées :

- par les acides : hydrolyse acide, utilisation de l'acide nitreux ;
- par oxydations : l'ozonolyse, l'oxydation par le periodate ou encore d'autres molécules.

1.1- L'hydrolyse acide

En 1874, Nægeli [1] publiait une méthode de dépolymérisation acide de l'amidon menant à des fractions de degrés de polymérisation variés. Depuis, différents réactifs chimiques ont été utilisés lors d'hydrolyses acides, il faut citer : l'acide hydrochlorhydrique, les acides nitriques et phosphoriques ou encore l'acide fluorhydrique. L'ensemble de ces méthodes produit des oligomères dont le degré de polymérisation est varié avec des indices de polydispersité généralement élevés. L'hydrolyse de la liaison glycosidique a lieu selon le mécanisme présenté en figure 1. Il s'agit d'une S_N1 dont l'étape limitante est la formation de l'ion carbonium.

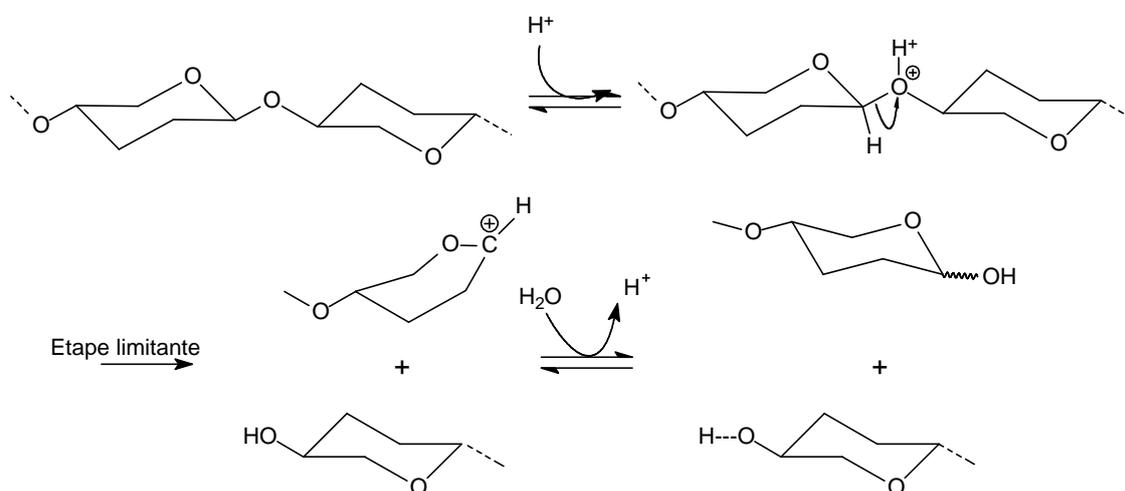


Figure 1 : Mécanisme d'hydrolyse de la liaison glycosidique

La vitesse de l'hydrolyse acide est donc proportionnelle au pH du système et augmente en fonction de la température. Des polymères possédant des chaînes de tailles variables peuvent être obtenues en jouant sur ces deux facteurs mais également sur le temps de la réaction. Une hydrolyse prolongée des polysaccharides mène à une dépolymérisation plus destructrice, ne permettant pas de préserver les proportions en monosaccharides [2]. De plus, pour les polysaccharides sulfatés, il existe

un risque potentiel d'hydrolyser les groupements sulfates ce qui changerait la composition des unités répétées [3] et pourrait modifier l'activité biologique de ceux-ci.

De nouvelles méthodes de dépolymérisations acides du chitosan par HCl gazeux [4] ont récemment été proposées afin de mieux maîtriser le degré de dépolymérisation et de faciliter la préparation d'oligomères avec un degré de polydispersité faible. Cette dépolymérisation, qui peut être réalisée sur le polymère à l'état solide, est dépendante du degré d'hydratation et de la concentration en HCl. Deux réactions se produisent : tout d'abord la saturation de l'eau d'hydratation du polymère par HCl puis la protonation du groupement amine libre. HCl agit dans un premier temps comme réactif pour former l'hydrochlorure nécessaire à la dépolymérisation et ensuite comme catalyseur de la réaction d'hydrolyse. Ce procédé a d'ores et déjà fait l'objet d'un brevet dans le cadre de la dépolymérisation de chitine, chitosane et D-glucosamines [5]. Dans un autre brevet portant sur l'hydrolyse des fucanes par l'acide sulfurique, il a été montré que cette méthode permettait d'isoler des fucanes de faible masse molaire. Ces dérivés de fucanes après hydrolyse conservent le taux de sulfate du fucane initial et présentent des propriétés héparinomimétiques : anticoagulante et anticomplémentaire [6].

1.2- Utilisation de l'acide nitreux

Cette voie de dépolymérisation est spécifique aux polysaccharides possédant des sucres aminés. L'acide nitreux est depuis longtemps utilisé pour étudier la structure des sucres aminés [7,8] et par conséquent la stœchiométrie et les produits de cette réaction sont parfaitement connus [9,10,11]. Cette réaction est rapide, sélective et parfaitement contrôlée.

Les espèces nitrosées provenant de l'acide nitreux attaquent sélectivement les groupes aminés provoquant la rupture des liaisons β -glycosidiques de la chaîne polymérique (figure 2). Ainsi, une mole de HONO est consommée pour une mole de groupe NH_2 réagissant.

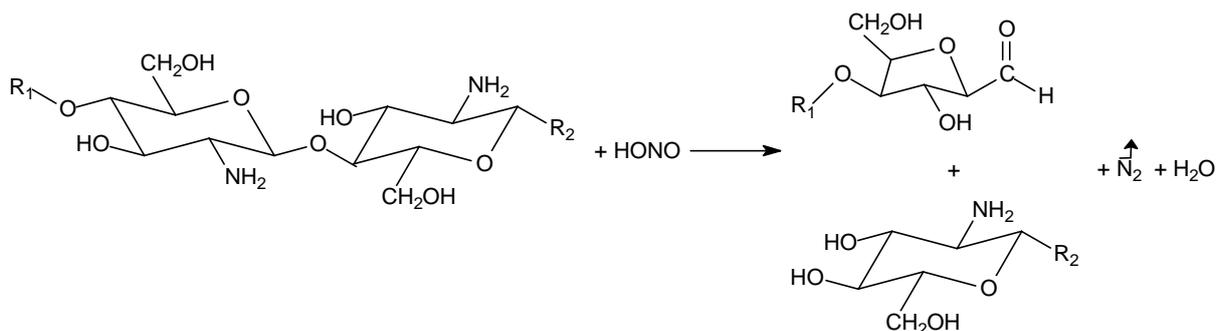


Figure 2 : Réaction de dépolymérisation du chitosane par l'acide nitreux [12]

HONO étant un acide relativement faible, un pH inférieur à 2 est suffisant pour transformer les ions nitrites NO_2^- en HONO. Le polysaccharide aminé est donc préalablement dissous dans une solution diluée d'acide chlorhydrique [12]. La stœchiométrie et la spécificité de cette réaction permettent de produire des polysaccharides de taille choisie lorsque le polysaccharide possède des fonctions amines. De nombreuses héparines de bas poids moléculaires sont produites commercialement par cette méthode (Dalteparin, Nadroparin, Reviparin...).

1.3- L'ozonolyse

L'oxydation sélective des liaisons β -D-glycosidiques de polysaccharides par l'ozone peut être utilisée comme une méthode générale de dépolymérisation des polysaccharides. Cette méthode efficace, bon marché et contrôlable permet d'obtenir de petits polysaccharides tout comme des fragments oligosaccharidiques de grandes tailles. En effet, le poids molaire moyen du produit obtenu peut être contrôlé par le taux ou la quantité d'ozone qui passe dans le mélange.

Cette méthode par ozonolyse a été développée [13] pour dépolymériser sélectivement des polysaccharides contenant des liaisons β -D-aldosidiques après peracétylation et en les traitant ensuite par de l'ozone dans des solvants organiques. La protection a pour but de protéger le substrat de réactions indésirables ou secondaires. L'ozonolyse sélective de β -D-aldoside se produit sous un fort contrôle stéréoélectronique et seulement lorsque les aldosides se trouvent en conformation 4C_1 .

Une méthode simplifiée peut être réalisée en solution aqueuse lors d'un protocole « one step » et « one pot » [14] : les polysaccharides, cette fois-ci, non protégés sont directement traités par de l'ozone en solution aqueuse pour donner rapidement de plus petits fragments. Ainsi, le polysaccharide est dissous dans un tampon phosphate ou dans une solution de NaHCO_3 . Puis, l'ozone est mis à buller dans cette solution et le pH est ajusté par ajout d'une solution de NaOH . Le mécanisme principal de dégradation est l'oxydation sélective de β -D-glycosides par l'ozone pour former un ester qui est simultanément saponifié pour conduire à des fragments plus petits (figure 3).

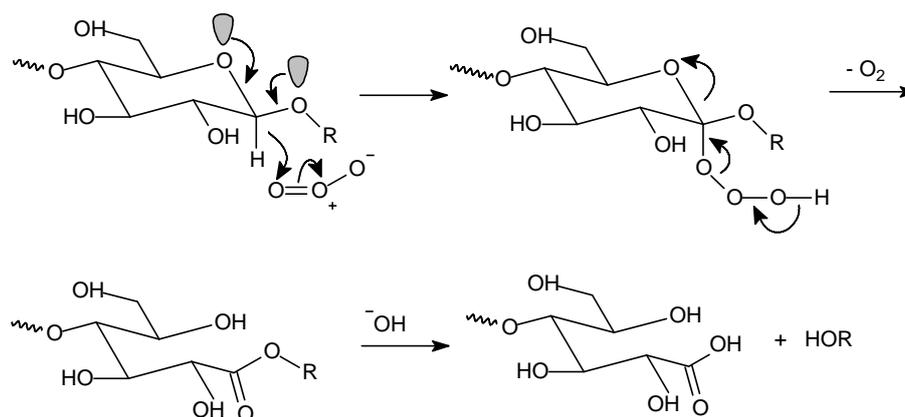


Figure 3 : Oxydation sélective de β -D-glycosides [14]

Cependant, l'oxydation de liaisons glycosidiques de carbohydrates non protégés lors de l'ozonolyse est compliquée par l'apparition de réactions secondaires. Les mécanismes de dégradation non sélective incluent la dégradation oxydative par des espèces radicalaires qui oxydent les résidus glycosidiques en acide formique, acétique ou oxalique (figures 4). La formation de ces acides suggère que la réaction procède par un mécanisme radicalaire dans lequel l'ozone attaquerait l'eau et formerait des radicaux oxy- et/ou hydroxy ce qui conduirait à la dégradation. Radicaux et acides peuvent tout deux attaquer les polysaccharides et ces dégradations ne sont pas spécifiques des β -D-glycosides.

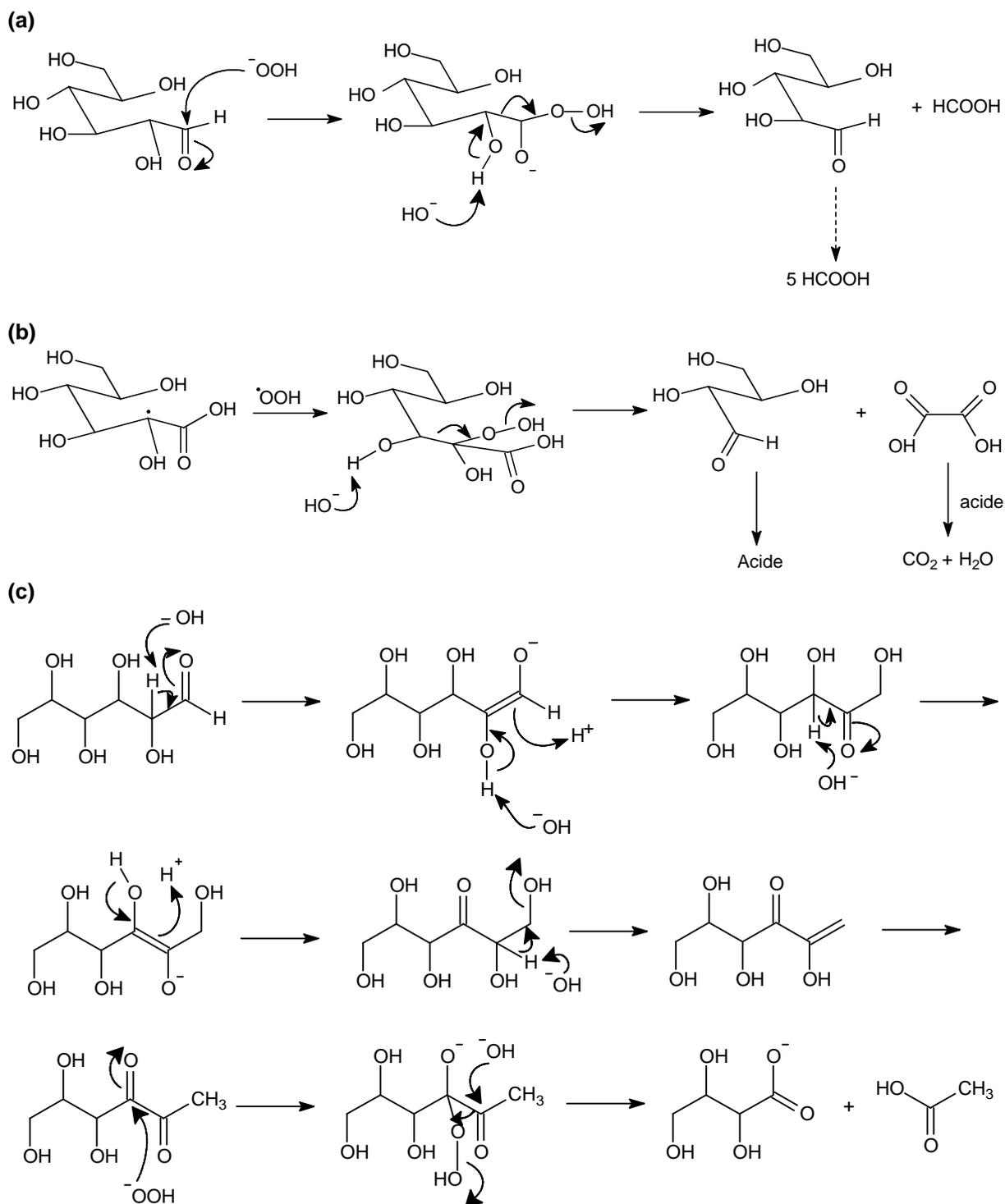


Figure 4 : Mécanismes de formation de l'acide formique (a), de l'acide oxalique (b) et de l'acide acétique (c)[14]

La dégradation non sélective causée par les acides formés est minimisée par l'utilisation de tampons basiques. De plus, le taux de dépolymérisation et son étendue maximale augmentent de façon marquée à mesure que la température s'élève. Des études suggèrent que la réactivité et la quantité de radicaux dans le système ainsi que son accessibilité physique sont les facteurs clés qui expliquent les profils de dépolymérisation observés [15].

Les carbohydrates sont donc dégradés en solution aqueuse via différents mécanismes: oxydation ozonolytique de liaisons β -D-aldosidiques, dégradation oxydative par des espèces radicalaires et

hydrolyse acide. L'oxydation lors de l'ozonolyse de liaisons β -D-aldosidiques conduit à une dépolymérisation sélective de polysaccharides alors que les deux autres mécanismes mènent à une réaction non sélective.

Cette méthode très simple, en une étape et par simple bullage d'ozone, peut être utilisée pour générer de petits polymères, ou des fragments oligomériques plus importants, pour des applications dans lesquelles des différences de structures minimales peuvent être tolérées.

1.4- L'oxydation par le periodate

L'oxydation par le periodate a été largement utilisée en tant que méthode de routine pour l'élucidation de structures complexes de polysaccharides.

Cette dégradation dite de Smith se fait en trois étapes. Dans une première étape l'addition de NaIO_4 conduit à l'oxydation des liaisons glycosyles C-C ayant des groupes hydroxyles adjacents ou un groupe hydroxyle et un groupement amine voisins pour former des aldéhydes (figure 5). Les facteurs stériques contrôlent la vitesse de la réaction. En effet, les diols en cis (représentation d'Haworth) sont plus facilement amenés dans la conformation nécessaire à la formation du complexe et par conséquent plus facilement oxydés que les diols en trans. Dans une seconde étape ces aldéhydes sont réduits en alcools primaires par ajout de NaBH_4 . Dans une troisième étape, les fragments glycosyles résultant sont éliminés par hydrolyse acide douce. La réaction peut être stoppée par ajout de glycérol. Les points de clivage possible lors de la dégradation de Smith sont nombreux.

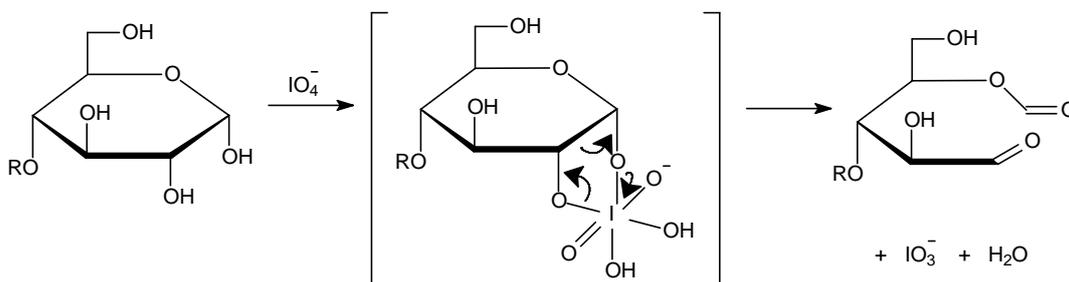


Figure 5: Mécanisme d'oxydation par le periodate

Les études récentes menées par Balakrishnan [16] se sont intéressées plus particulièrement à la dépolymérisation de l'alginate de sodium lors de l'oxydation par le periodate. Une dépolymérisation plus importante est observée lors d'une augmentation de la concentration en periodate due à une oxydation et à un clivage plus importants du polymère. Lors de l'oxydation, des produits secondaires tels que de l'acide acétique, des formaldéhydes ou des acétaldéhydes peuvent se former. La dépolymérisation serait induite par deux mécanismes : un mécanisme rapide, indépendant de la formation de radicaux hydroxyles, et l'autre beaucoup plus lent, dû à de faibles concentrations en radicaux hydroxyles. Le mécanisme indépendant de la dégradation radicalaire a été attribué au clivage de monomères peu fréquents et inhabituels au niveau de l'alginate entraînant des coupures dans la chaîne principale [17]. La dépolymérisation radicalaire observée serait due à la génération de radicaux à partir d'impuretés phénoliques présentes dans l'alginate pendant l'oxydation.

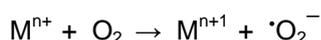
Au bilan, il semble que la dépolymérisation par cette voie soit difficilement contrôlable et entraîne la formation de nombreux produits secondaires.

1.5- Autres molécules oxydantes

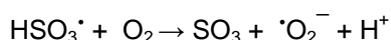
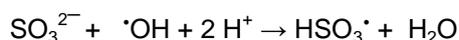
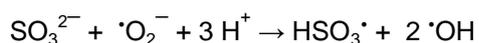
Cette voie de dépolymérisation est plus particulièrement utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour des polysaccharides tels que l'amidon, la gomme guar ou encore les alginates. Des molécules oxydantes telles que l'acide ascorbique ou les sulfites sont alors utilisées. Le terme « oxidative reductive depolymerization » (ORD) est généralement utilisé dans la littérature pour qualifier ces réactions.

Une hypothèse de mécanisme concernant la dépolymérisation par le sulfite a été proposée par Vallès- Pàmies et al [18]. En effet, la présence de sulfites permet d'initier la formation d'espèces radicalaires (peut être via une initiation par des ions métalliques) et ce sont ces radicaux qui attaquent le polymère et provoquent sa dépolymérisation. Pourtant, il est connu que les sulfites peuvent exercer une protection des polysaccharides vis à vis de la dégradation thermique en jouant le rôle de piègeurs d'oxygènes [19]. Les études menées sur de l'amidon [18,20] ont montré que pour de faibles concentrations en sulfite, le sulfite pouvait jouer tout au contraire un rôle d'oxydant. Le mécanisme envisageable de formation des radicaux est présenté figure 6.

Initiation :



Propagation :



Terminaison :

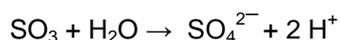
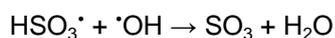


Figure 6: Hypothèse de mécanisme pour la formation, la propagation et la terminaison de radicaux en présence de sulfite.

Par contre pour des concentrations plus fortes en sulfites, il n'y a plus assez d'oxygènes libres permettant l'initiation de la réaction et donc peu ou pas de dépolymérisation observée.

Concernant la dépolymérisation par acide ascorbique, celle-ci se révèle plus efficace que lors de l'ajout de sulfites : les radicaux hydroxyles de l'ascorbate sont plus facilement réduits ce qui facilite la réaction. Cette technique a fait l'objet d'un brevet concernant la dépolymérisation de l'héparine [21].

Le comportement observé en fonction de paramètres tels que le pH, la T, la concentration en métaux et/ou en oxydants est propre à chaque polysaccharide.

La dépolymérisation par catalyse métallique à laquelle nous nous sommes intéressés et qui appartient à ce type de réaction sera plus développée dans un second paragraphe.

2- La dépolymérisation par catalyse métallique

La dépolymérisation par catalyse métallique est une méthode bien décrite pour les polysaccharides et notamment pour ceux de la famille des glycosaminoglycan(n)es (des héparines et

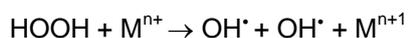
dermatanes sulfatés de bas poids moléculaires commercialisés sont produits par cette méthode : Fluxum, Ardeparin...)... Des études concernant des polysaccharides algaux comme les fucanes et des exopolysaccharides bactériens ont également été réalisées pour développer ce procédé de dépolymérisation à l'échelle industrielle. Cette méthode a donc été retenue pour ce travail de thèse concernant un exopolysaccharide encore peu étudié pour la préparation de dérivés de faible masse molaire.

2.1- La catalyse métallique

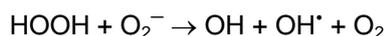
Des études réalisées sur l'héparine, le dermatane sulfate et d'autres polysaccharides comme les fucanes ont montré qu'il était possible d'obtenir des polysaccharides de faibles masses molaires sans dénaturer leur structure par une méthode de dépolymérisation radicalaire [21,22,23]. Cette méthode fait l'objet depuis quelques années d'applications dans le domaine des polysaccharides.

La réaction procède par la formation de radicaux libres OH[•] issus de la réaction d'un ion métallique avec le peroxyde d'hydrogène. Les mécanismes les plus souvent admis sont de 2 types:

- Une réaction de Fenton où le métal participe directement à la réaction

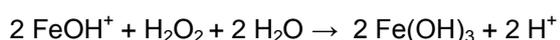


- Une réaction d'Haber Weiss où le métal ne joue qu'un rôle de catalyseur



Le passage par un ou des intermédiaires lors de la formation des hydroxyles fait encore l'objet d'études. Ces réactions sont applicables à de nombreux sels métalliques, les principaux utilisés sont le cuivre et le fer.

Les radicaux libres formés sont très réactifs et susceptibles de dégrader, à pH neutre et à température contrôlée, les polysaccharides. Une réduction du pH est observée lors de la dépolymérisation. En prenant l'exemple du fer, on peut dire que la réduction du pH est une conséquence de la capacité qu'à Fe(III) de former des hydroxydes en relargant des H⁺ dans la solution [24]. A pH neutre, FeOH⁺ est la principale espèce régissant en solution :



Pas ou peu de dépolymérisation a été observée dans la région de pH 3-5 lors de la dépolymérisation de l'héparine [22]. Une régulation du pH est généralement réalisée pour conserver un pH neutre.

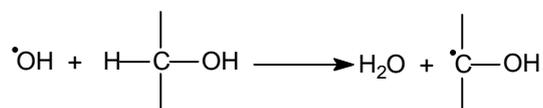
Un procédé, utilisant la dépolymérisation radicalaire et mis au point sur des fucanes, permet d'obtenir en une seule étape (sans fractionnement préparatif par chromatographie d'exclusion stérique) et avec un bon rendement, des fucanes de faible masse molaire (inférieure ou égale à 10 kDa) présentant une faible polydispersité [25].

Les conditions de cette réaction sont douces et elle peut être stoppée à tout instant par l'utilisation d'agents chélateurs pour piéger les ions métalliques. Cette réaction a l'intérêt de mener à une certaine sélectivité dans le clivage en fonction du métal utilisé en tant que catalyseur [26]. Les réactifs utilisés sont peu coûteux et peuvent être utilisés à grande échelle [27]. Cependant, à la possibilité de chélation des métaux par les polysaccharides s'ajoute le fait que la structure des produits et la spécificité du site de clivage restent incertaines.

2.2- Les mécanismes radicalaires possibles

Les mécanismes d'attaques radicalaires conduisant à la dépolymérisation des polysaccharides sont complexes et pour la plupart inconnus. Nous nous sommes intéressés aux hypothèses de mécanismes de dépolymérisation figurant dans la littérature.

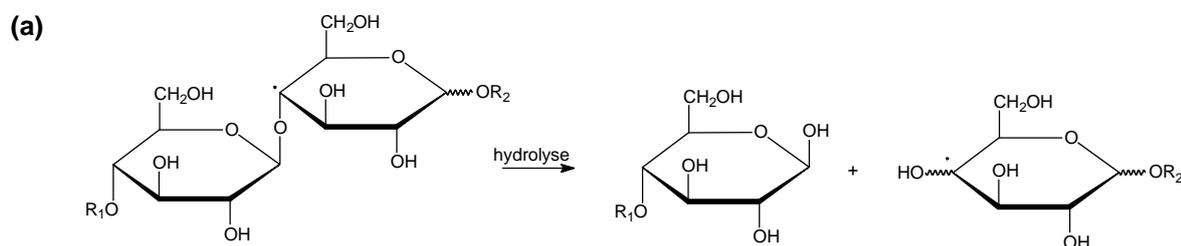
Les radicaux hydroxyles formés lors de la dépolymérisation par catalyse métallique conduisent à l'abstraction de liaisons carbone-hydrogène du polysaccharide :



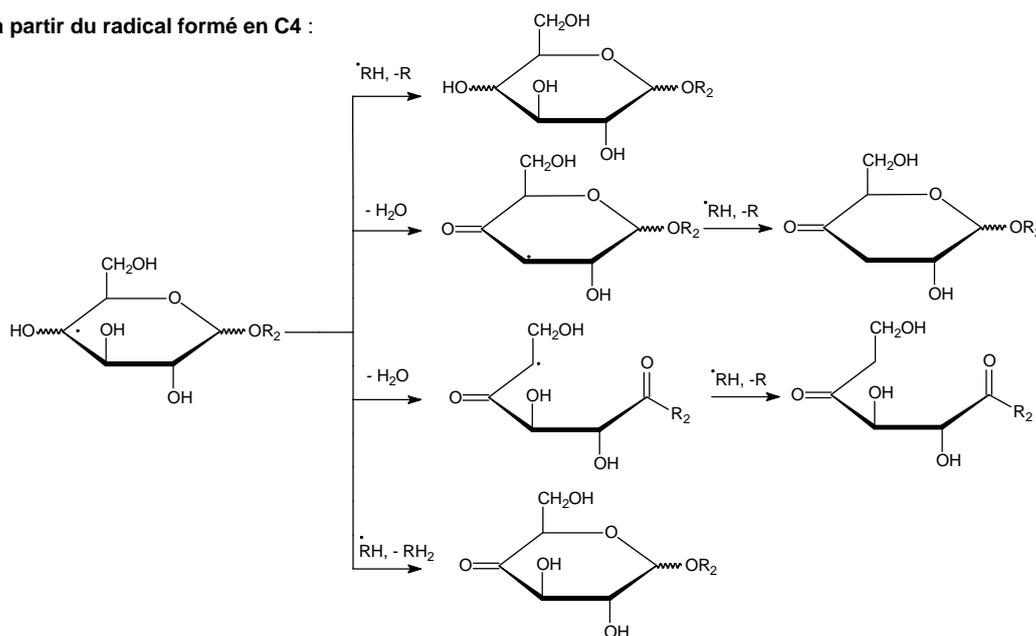
L'abstraction de liaisons oxygène-hydrogène est nettement moins fréquente [28].

La grande réactivité des hydroxyles diminue considérablement la sélectivité du site d'attaque. Ainsi pour un monosaccharide tel que le D-glucose six radicaux glucosyles primaires sont obtenus et ceci avec les mêmes rendements [29].

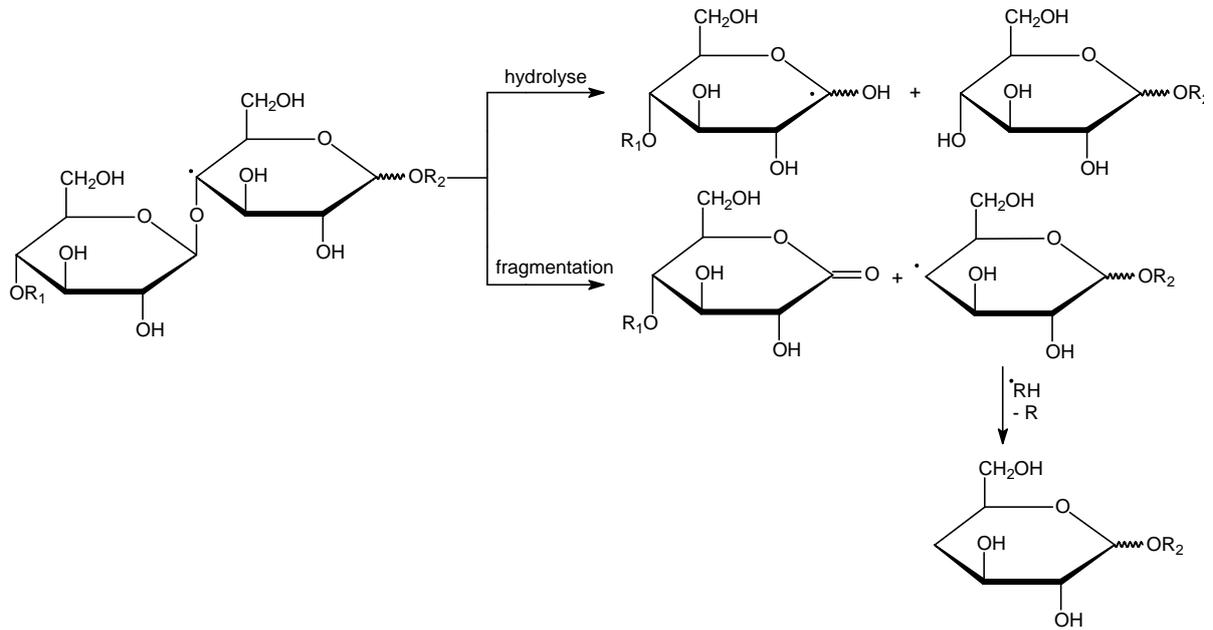
Les hypothèses de mécanismes de scission des liaisons glycosidiques sont pour la plupart issues d'études poussées menées sur le cellobiose (β -D-glucopyrannosyl(1 \rightarrow 4)D-glucopyrannose) qui est un disaccharide neutre produit lors de dégradation de la cellulose [30]. La figure 7 reprend l'ensemble des mécanismes proposés (hydrolyses, éliminations, réarrangements) lors de la coupure d'une liaison (1,4) du cellobiose extrapolés aux coupures glycosidiques au sein des polysaccharides pendant la dépolymérisation. L'hypothèse de structure proposée faisant également apparaître des liaisons (1,3), les mécanismes proposés à partir de la formation du radical en C3 ont été représentés en figure 8 .



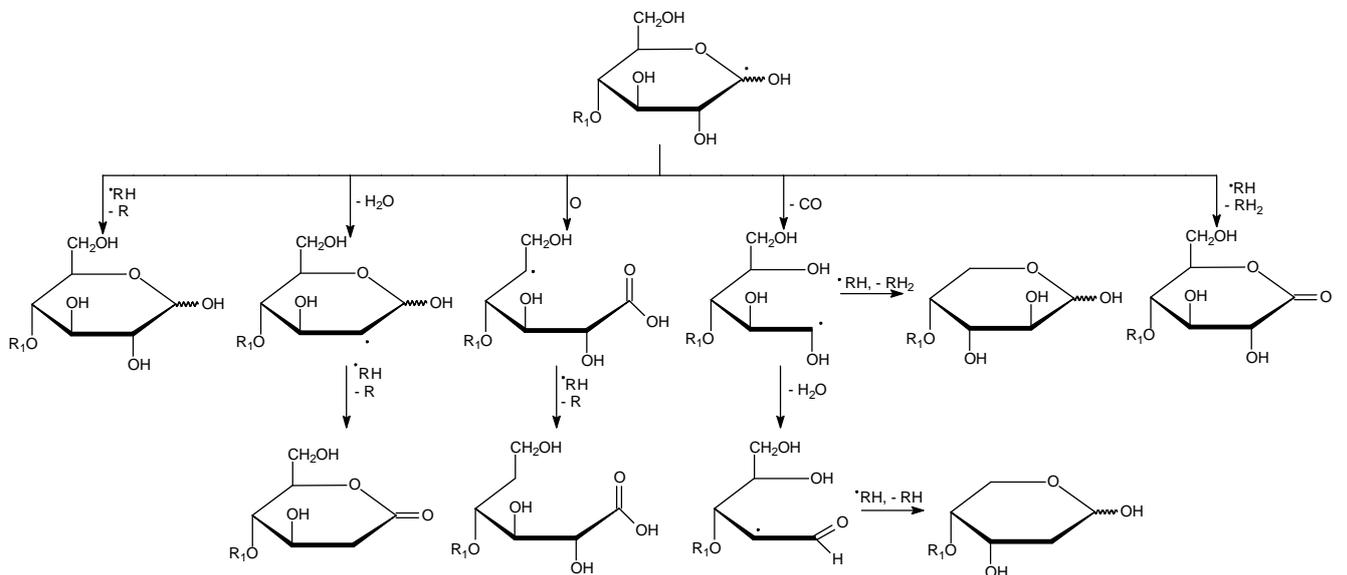
Puis à partir du radical formé en C4 :



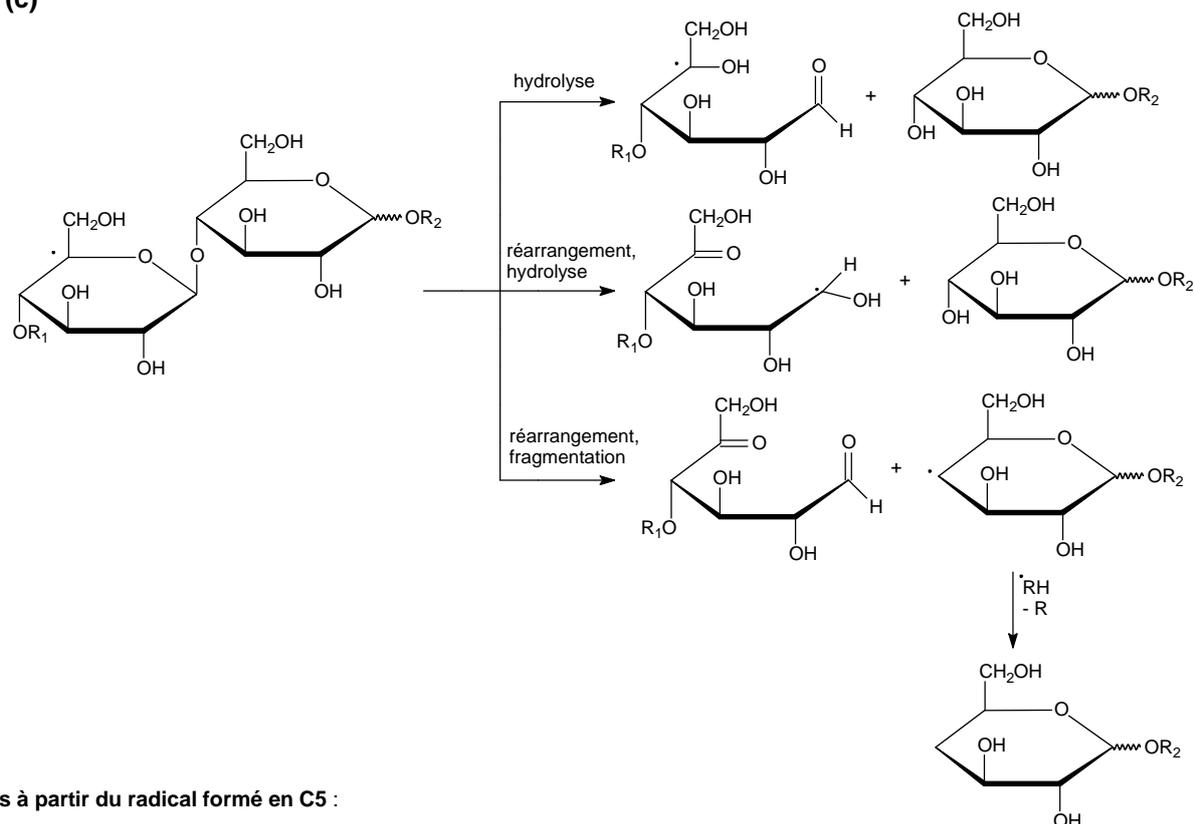
(b)



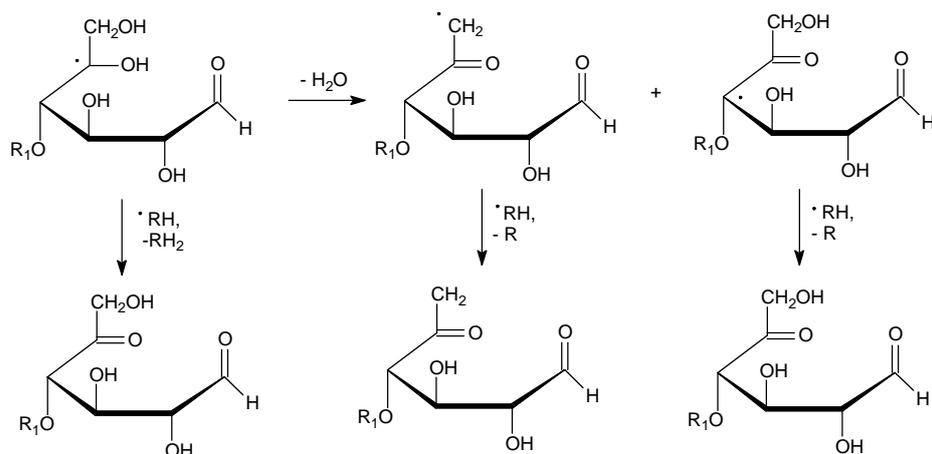
Puis à partir du radical formé en C1 :



(c)



Puis à partir du radical formé en C5 :



Et

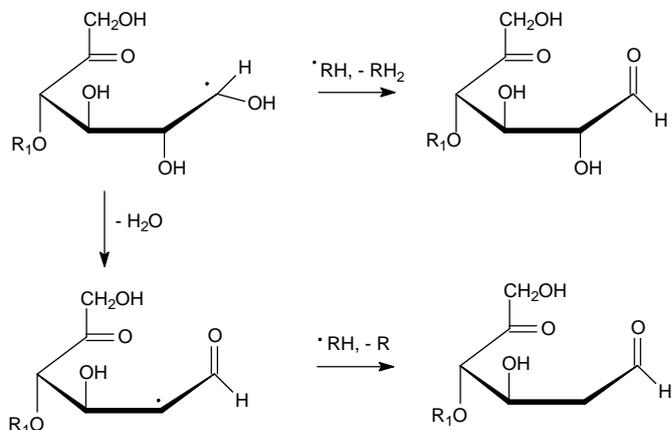


Figure 7: Ensemble des mécanismes radicalaires proposés lors de la rupture d'une liaison glycosidique Glc-Glc (1,4).

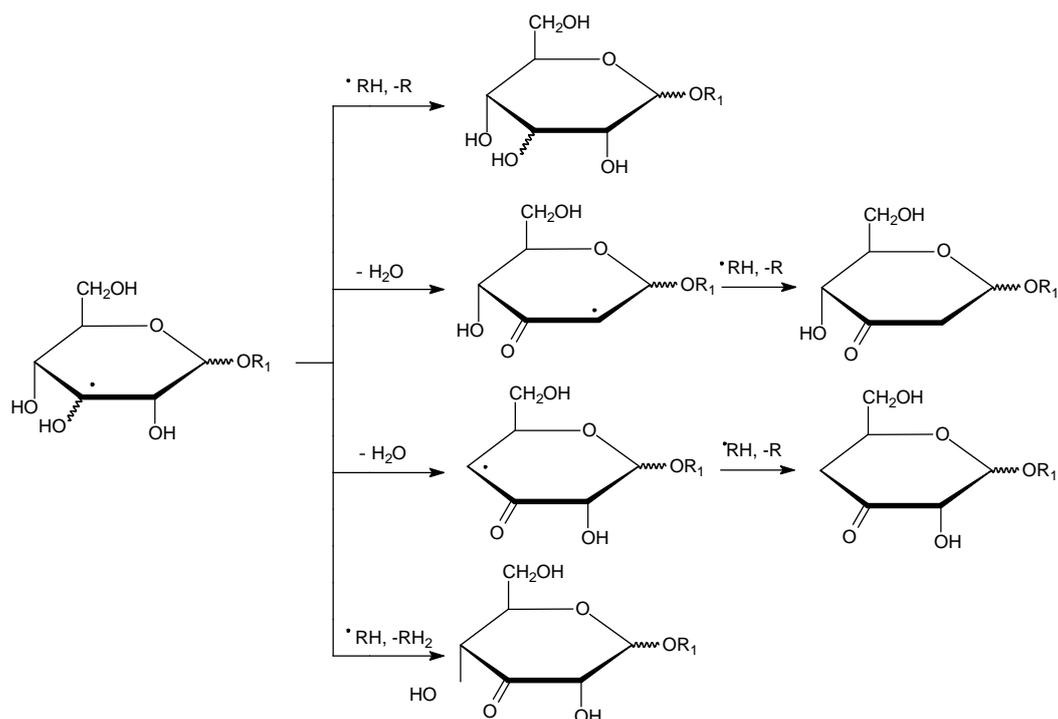


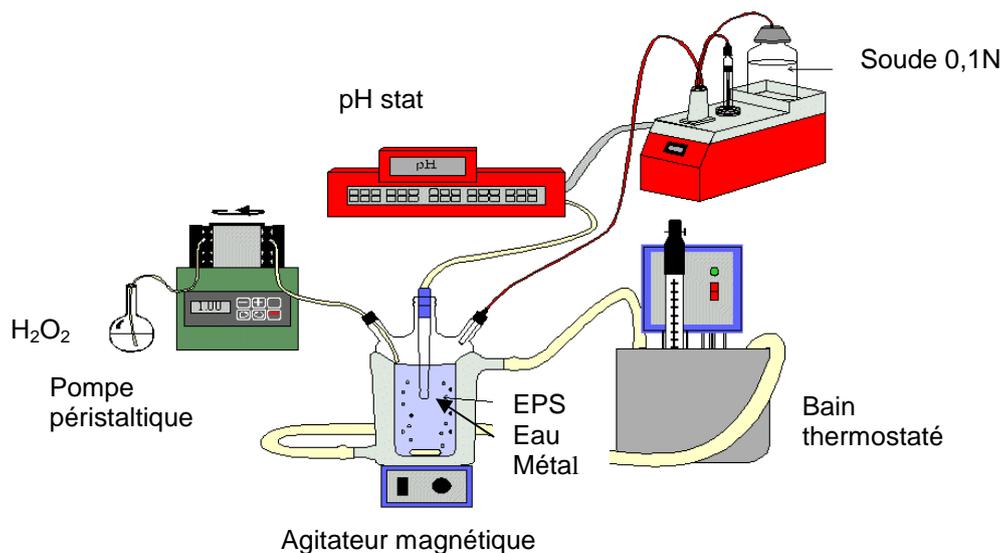
Figure 8: Mécanismes radicalaires proposés à partir du radical en C3, exemple d'une unité glucose.

3- Matériel et méthodes générales de caractérisation

3.1- EPS utilisé

Ces travaux ont entièrement été réalisés sur un lot industriel de l'exopolysaccharide HYD 657 (lot 105 C3) caractérisé précédemment (partie 1, paragraphe 3.1). Ce lot possède une masse molaire moyenne en poids de $3.10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ en équivalent pectine.

3.2- Montage utilisé en dépolymérisation par catalyse métallique



La température du mélange est contrôlée par un bain thermostaté. Le contrôle du débit de l'ajout d'H₂O₂ est réalisé à l'aide d'une pompe péristaltique. Une sonde pH stat permet de contrôler le pH et

d'ajuster celui-ci par ajout de soude pendant la manipulation. L'ensemble des manipulations ont été menées sur 200 mg d'EPS natif. La quantité de peroxyde d'hydrogène introduite sera par la suite donnée en terme de ratio massique R avec $R = \frac{\text{masse totale de peroxyde d'hydrogène introduite}}{\text{masse initiale d'EPS}}$.

3.3- Les techniques d'analyses

La plupart des techniques utilisées ont été développées dans le paragraphe 3 de la Partie 1.

a) Détermination des masses molaires

Les masses molaires au pic, moyennes en masse et en nombre ont été déterminées par HPSEC.

b) Détermination de la composition globale

La composition globale en oses a été déterminées par des dosages colorimétriques : le dosage des oses totaux a été réalisé par l'orcinol et celui des acides uroniques par le 3-hydroxybiphényl.

c) Caractérisation des résidus glycosidiques

L'analyse en CPG des méthylglycosides triméthylsilylés, obtenus après méthanolyse et silylation du polymère natif, permet de déterminer la composition en monosaccharides du polymère.

d) Dosage des métaux

Les dosages de métaux ont été réalisés au Service Central d'Analyse de Vernaison.

e) Détermination de la viscosité

Un viscosimètre rotatif a permis d'évaluer la viscosité des échantillons.

4- Résultats et discussions

4.1- Mise au point de la dépolymérisation radicalaire sur l'EPS HYD 657

Cette voie de dépolymérisation par catalyse métallique a déjà été utilisée pour préparer des dérivés de faible masse molaire à partir d'un autre EPS, le GY 785 présentant une unité répétitive très différente de celle de l'EPS HYD 657 [32,33,34]. Les résultats de ces travaux ont servi de point de départ pour les premiers essais sur l'EPS HYD 657, en recherchant comme demandé par l'industriel:

- Les conditions expérimentales optimales de dépolymérisation pour obtenir des dérivés de masses molaires variables et peu polydispersés avec un bon rendement;
- Le procédé le plus simple pour éviter certaines étapes de purification souvent coûteuses (utilisation d'une résine chélatante, ultrafiltration).

4.2- Etudes préliminaires

Afin d'adapter les conditions expérimentales à l'EPS HYD 657 et de mesurer l'importance sur la dépolymérisation des différents facteurs, différentes conditions expérimentales ont été testées. De façon intuitive, trois facteurs nous ont paru importants : la quantité de métal ajoutée, le ratio massique H₂O₂/EPS et la durée de la réaction qui est ajustée par le débit d'ajout d'H₂O₂ (0,66% m/m). La température a, quant à elle, été fixée arbitrairement à 50°C. Un plan d'expérience rapide a été dressé.

PARTIE 2 : Etude de deux voies chimiques de dépolymérisation : La catalyse métallique et l'électrochimie

Les ordres de grandeurs en réactifs ont été conservés par rapport aux études menées précédemment sur d'autres EPS. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 1. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 70% en masse.

Entrée	A	B	C	D
Acétate de cuivre	36 mg (0,18 mmol)	54 mg, (0,27 mmol)	36 mg, (0,18 mmol)	36 mg, (0,18 mmol)
R(H ₂ O ₂ /EPS)	0,2	0,2	0,4	0,2
Durée de la réaction ajustée par le débit d'ajout d' H ₂ O ₂	1h 1 ml/min	1h 1 ml/min	1h 1 ml/min	2h 0,5 ml/min
M _p (g/mol)	59 600	28 100	9 540	8 640
M _w (g/mol)	69 200	52 380	17 590	20 300
M _n (g/mol)	16 700	10 250	7 240	4 420
I _p	4,1	5,1	2,4	4,6

Tableau 1 : Premiers résultats de dépolymérisation obtenus en faisant varier trois facteurs : la quantité de métal, la quantité d'H₂O₂ ajoutée et le débit d'ajout de ce dernier. Remarque : les résultats des colonnes C et D ont été obtenus avec une colonne Superdex Peptide permettant de faire des mesures précises de masses molaires en dessous de 20 000 g.mol⁻¹.

Ces résultats semblent montrer que 2 des 3 facteurs sont principalement intéressants pour obtenir des échantillons variés : le rapport H₂O₂/EPS et la durée de l'ajout. Ainsi, le passage d'un ratio massique de 0,2 à 0,4 en H₂O₂ par rapport à l'EPS permet de diviser par 4, M_w. De même, la masse molaire obtenue pour une même quantité d'H₂O₂ ajoutée est divisée par 3,5 lorsque le H₂O₂ est introduit plus lentement (durée d'ajout doublée). L'augmentation de la quantité de métal n'a, quant à elle, pas permis d'améliorer l'efficacité de la dépolymérisation dans les mêmes proportions que les facteurs précédents.

Ces premiers résultats ont dû être vérifiés. Ces séries de manipulations ont été renouvelées au moins deux fois, toujours sur des solutions d'EPS de 100ml à 2g/l, afin de vérifier leur reproductibilité (tableau 2).

Conditions		A	B	C	D
Acétate de cuivre (18g/L)		2 ml	3 ml	2 ml	2 ml
R(H ₂ O ₂ /EPS)		0,2	0,2	0,4	0,2
Durée de la réaction (ajustée par le débit)		1h	1h	1h	2h
M _p (g/mol)	1 ^{ère} Série	59 600	28 100	9 500	8 600
	2 ^{ème} Série	10 000	8 600	6 800	8 500
	3 ^{ème} Série	45 700	53 500	6 400	8 800
M _w (g/mol)	1 ^{ère} Série	69 200	52 400	17 600	20 300
	2 ^{ème} Série	20 500	19 200	8 500	17 200
	3 ^{ème} Série	45 700	53 500	24 100	24 800
M _n (g/mol)	1 ^{ère} Série	16 700	10 300	7 200	4 400
	2 ^{ème} Série	8 700	7 400	5 600	7 300
	3 ^{ème} Série	10 600	16 000	6 400	3 900
I _p	1 ^{ère} Série	4,1	5,1	2,4	4,6
	2 ^{ème} Série	2,4	2,6	1,6	2,4
	3 ^{ème} Série	4,3	3,3	3,8	6,3

Tableau 2 : Première étude de reproductibilité de la dépolymérisation par catalyse métallique en faisant varier 3 facteurs : la quantité de métal, la quantité d'H₂O₂ ajoutée et le débit d'ajout de ce dernier.

Lorsque les masses molaires moyennes en masse pour les différentes conditions sont comparées nous observons que :

- dans les cas A et B, c'est à dire pour un ratio faible en H_2O_2 et le débit le plus important d'ajout d' H_2O_2 les résultats obtenus ne montrent pas une bonne reproductibilité.
- dans les conditions C et D, c'est-à-dire pour des ratios plus importants en H_2O_2 ou pour une durée de réaction allongée par un débit plus faible d'ajout en H_2O_2 , la dépolymérisation ne semble pas poser de problèmes de reproductibilité.

Pour réaliser un plan d'expériences interprétable, la réaction doit être parfaitement contrôlée et chaque résultat fiable. Les problèmes de reproductibilité rencontrés lors des études préliminaires nous ont donc contraints à abandonner l'utilisation des plans d'expériences qui auraient pu permettre la diminution du nombre de manipulations nécessaires à l'optimisation de la dépolymérisation par catalyse métallique. Chaque expérience a, par la suite, été au minimum triplée afin de vérifier la reproductibilité des résultats obtenus.

4.3- Mise en place des conditions

a) Influence de la température

Les réactions radicalaires ont de très faibles énergies d'activation et ne sont, par conséquent, normalement pas influencées par la température. L'influence de la température a tout de même été évaluée entre 20°C (température ambiante) et 50°C (figure 9). La dépolymérisation à température ambiante n'est pas satisfaisante : le mélange initial est, en effet, beaucoup plus visqueux et le cuivre s'est révélé plus difficile à homogénéiser. Ainsi, visuellement, la formation de gouttes bleues de sels de cuivre dans le mélange en début de réaction a été observée. Comme le montre la figure 10, en passant de 50 à 20°C la viscosité est multipliée par 2. L'inhomogénéité du mélange peut donc expliquer en grande partie la diminution de l'efficacité de la dépolymérisation observée à 20°C. A 35°C, une amélioration de la cinétique de dépolymérisation est déjà observée mais les meilleurs résultats ont été obtenus à 50°C. Lors des manipulations suivantes une température de réaction de 50°C a donc été retenue.

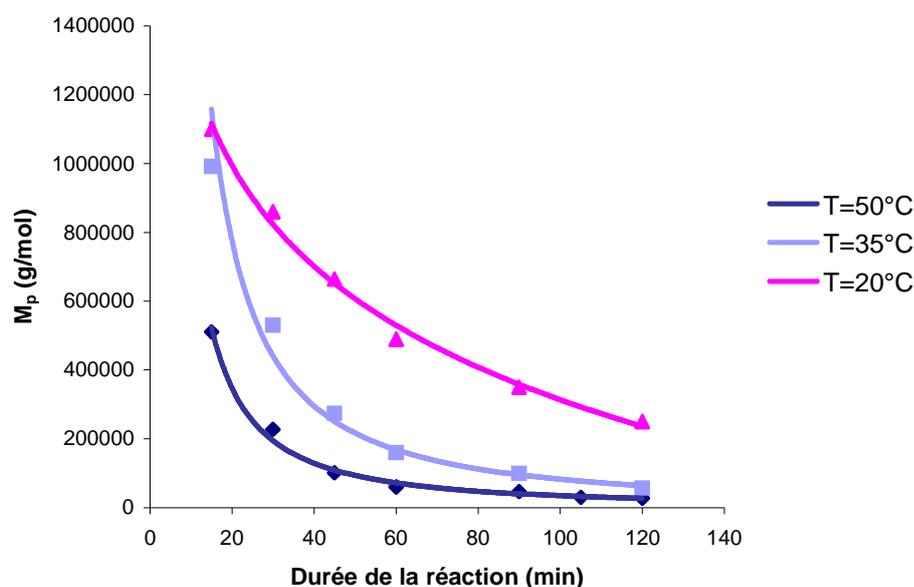


Figure 9 : Cinétique de dépolymérisation pour différentes températures

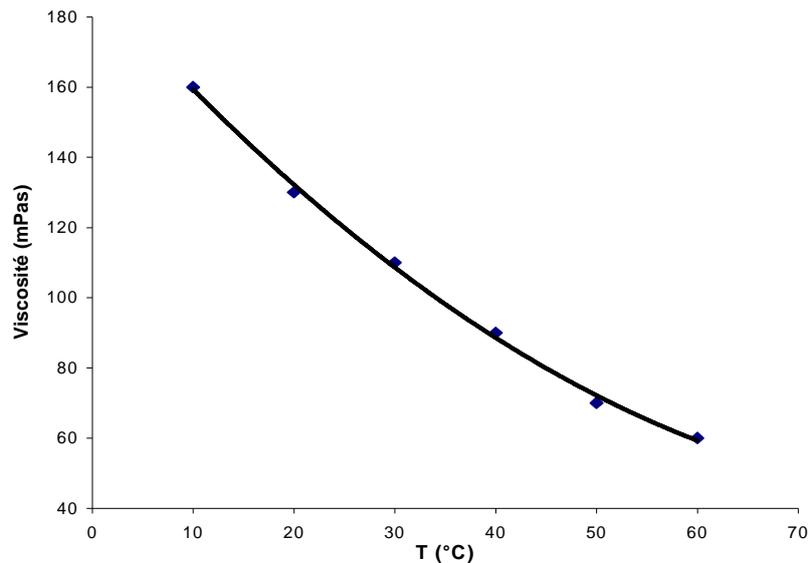


Figure 10 : Evolution de la viscosité pour une solution d'EPS à 2g/L entre 10 et 60°C.

b) Réduction des échantillons après dépolymérisation

Les chaînes osidiques doivent être systématiquement réduites par le borohydrure de sodium (NaBH_4) (figure 11) après dépolymérisation afin de stabiliser les extrémités réductrices et éliminer certains produits d'oxydation instables qui peuvent être formés (carbonyles, peroxydes...). NaBH_4 permet de réduire de façon exclusive les liaisons carbonyles sans toucher aux fonctions acides ou aux dérivés d'acide. Les produits obtenus après ultrafiltration et lyophilisation peuvent ainsi être conservés plusieurs mois à l'abri de la lumière et de l'humidité. Nous avons par ailleurs vérifié que les échantillons lyophilisés sans être préalablement réduits jaunissaient et se dégradent au bout de quelques semaines.

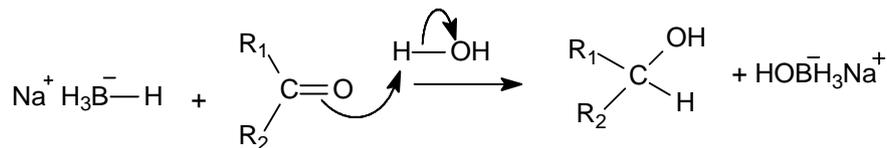


Figure 11 : Réduction des liaisons carbonylées par le NaBH_4

c) Importance du ratio $\text{H}_2\text{O}_2/\text{EPS}$

Pour une même quantité de métal (sulfate de cuivre afin d'homogénéiser le contre-ion utilisé par la suite pour les différents métaux) et d'EPS et pour une durée d'ajout fixée à 2h, différents ratios massiques finaux $\text{H}_2\text{O}_2/\text{EPS}$ ont été testés (figure 12).

Les résultats obtenus montrent, comme attendu, que la quantité d' H_2O_2 ajoutée et donc la quantité de radicaux hydroxyles formés par la réaction de type Fenton, permettent de contrôler facilement la dépolymérisation. En effet, pour une même quantité d' H_2O_2 introduite, les cinétiques réalisées se sont montrées très reproductibles.

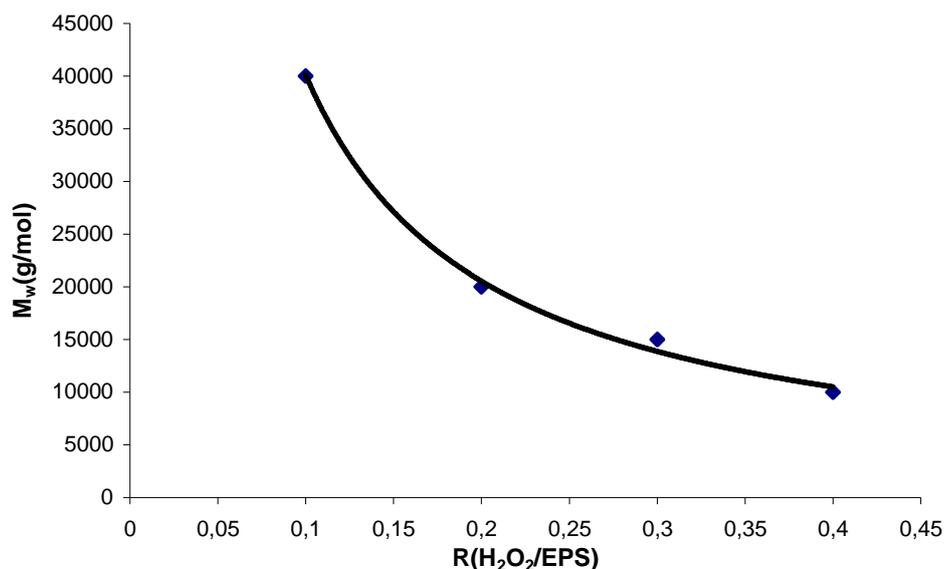


Figure 12 : Evolution de la M_w en fonction du ratio massique final en H_2O_2

Ainsi, dans ce protocole, les courbes de cinétique obtenues permettent de choisir plus précisément, pour un débit donné, la quantité d' H_2O_2 à introduire en fonction de la M_w recherchée (figure 13). Ce ratio est une donnée facilement accessible qui ne traduit par contre pas la quantité d' H_2O_2 réellement consommée ou disponible à un temps t . Les concentrations en H_2O_2 au cours de la réaction n'ont pu être mesurées en raison des interférences avec les ions métalliques sur le dosage. Au cours de ces cinétiques, nous avons pu vérifier que l'indice de polydispersité évolue de façon similaire à la masse molaire en masse (figure 13).

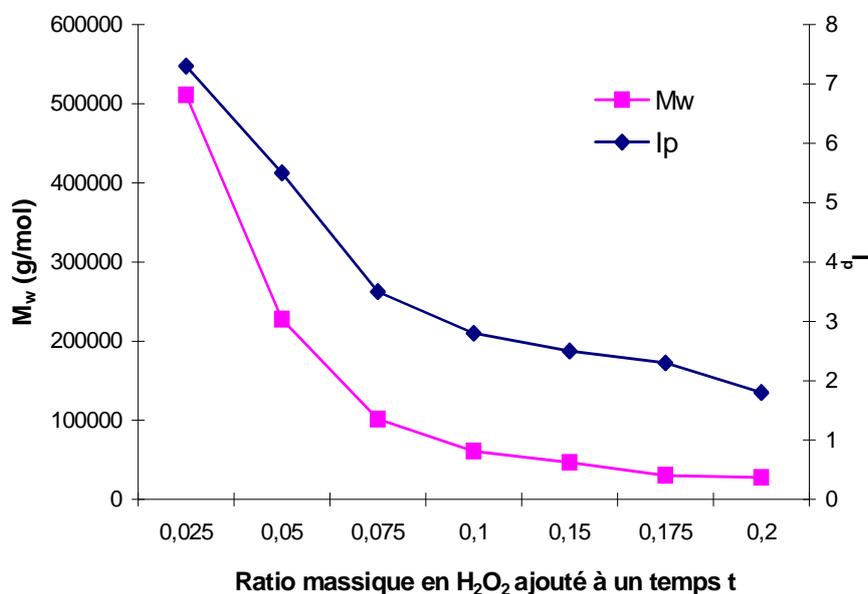


Figure 13 : Evolution de la M_w et de l_p lors de dépolymérisation par catalyse métallique (en présence de sulfate de cuivre pour $R=0,2$) en fonction du rapport entre la masse d' H_2O_2 introduite à un temps t et la masse d'EPS initial.

L'évolution de la viscosité a également été suivie sur plusieurs manipulations lors de la dépolymérisation. Comme attendu, une diminution de la viscosité accompagne la dépolymérisation (figure 14) et le profil de la courbe obtenue est identique à celui de l'évolution de M_w . En effet, lors de

la dépolymérisation, les chaînes sont coupées et deviennent ainsi plus mobiles entraînant une diminution de la viscosité qui va de paire avec une diminution de M_w .

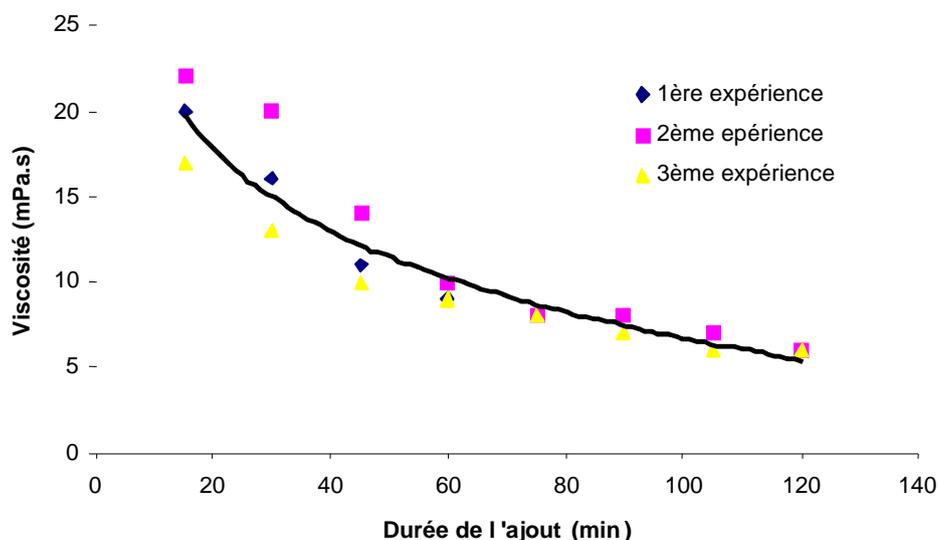


Figure 14: Evolution de la viscosité, mesurée avec un viscosimètre rotatif, pendant l'avancée de la dépolymérisation

La composition osidique et l'existence de ramifications jouent probablement un rôle essentiel dans le comportement des EPS lors de la dépolymérisation. Ainsi, les études menées au laboratoire de l'Ifremer semblent montrer qu'une composition riche en acide uronique facilite la dépolymérisation. Le rôle, notamment, des phénomènes de chélation lors de la dépolymérisation sera rediscuté par la suite.

Les compositions osidiques ont été déterminées par l'analyse des méthylglycosides-TMS pour des dérivés dépolymérisés de l'HYD 657 pour deux rapports massiques finaux en H_2O_2 (0,2 et 0,4) et comparées à l'EPS natif (tableau 3).

EPS	Rha %	Fuc %	Gal %	Glu %	Man %	GlcA %	GalA %	M_w (kDa)	I_p
natif	3,4	1,8	21,7	12,3	1,8	6,1	7,3	3000	4
R= 0,2	2,7	1,9	15,5	9,5	2,1	2,6	7,1	20	2,4
R= 0,4	3	1,7	11,2	7,6	1,3	2,8	7,2	10	2,5

Tableau 3 : Analyse des méthylglycosides-TMS par CPG de l'HYD 657 natif et après dépolymérisation pour deux ratios en H_2O_2 .

Les pourcentages obtenus en rhamnose, fucose, mannose et acide galacturonique restent voisins de ceux obtenus pour l'EPS natif. En revanche, contrairement à l'utilisation des ultrasons, une évolution de la composition a été observée pour le glucose et cette évolution est surtout importante pour le galactose et l'acide glucuronique. Une diminution de ces différents ratios est observée, celle-ci est plus importante lorsque l'échantillon est plus dépolymérisé. L'évolution des ratios en monosaccharides semble montrer que, contrairement à la dépolymérisation sous ultrasons, les radicaux hydroxyles générés pendant la dépolymérisation par catalyse métallique seraient sélectifs vis à vis de certains sucres et/ ou de certaines liaisons.

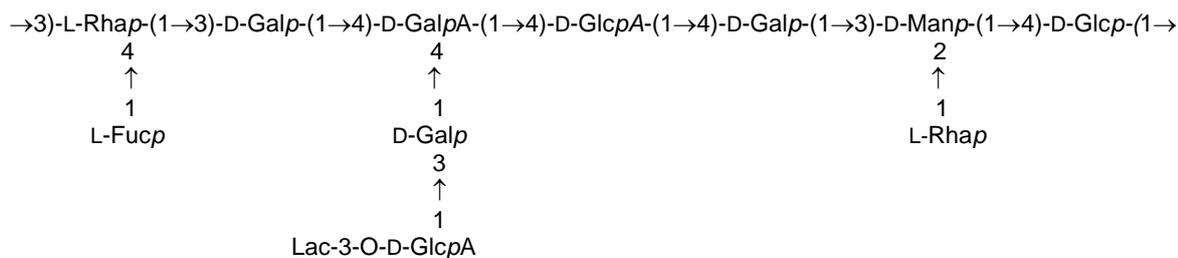


Figure 15 : Hypothèse de structure de l'EPS HYD 657

Ainsi si nous nous intéressons de plus près aux variations des ratios et à l'hypothèse de structure de l'EPS natif (figure 15) nous observons :

- pour le galactose et l'acide glucuronique pour $R=0,4$:

$$\frac{\%Gal(\text{natif})}{\%Gal(\text{dépolymérisé})} \approx \frac{\%GlcA(\text{natif})}{\%GlcA(\text{dépolymérisé})} \approx 2$$

- pour le rhamnose et le galactose pour $R=0,2$:

$$\frac{\%Rha(\text{natif})}{\%Rha(\text{dépolymérisé})} \approx \frac{\%Glc(\text{natif})}{\%Glc(\text{dépolymérisé})} \approx 1,3$$

Au vue de ces résultats et à la lumière de notre connaissance de la structure, une première hypothèse de mécanisme peut être formulée. Il semblerait que les hydroxyles s'attaquent préférentiellement aux liaisons Gal-GlcA et Rha-Glc de la chaîne principale du squelette. En effet, même après ultrafiltration les lactates sont toujours présents : nous pouvons donc penser que la liaison Gal-GlcA de la ramification n'est, a priori, pas touchée. Cette hypothèse devra être vérifiée par RMN.

d) Importance du débit d'ajout d' H_2O_2

Dans les expériences préliminaires, le débit d'ajout d' H_2O_2 avait été arbitrairement fixé à 1 ml/min et la durée de l'ajout à 1h, quelque soit la quantité d' H_2O_2 introduite. De mauvais résultats de reproductibilité avaient alors été obtenus. De nouvelles séries de manipulations ont été réalisées afin de voir l'importance du débit d'ajout pour une solution de même concentration en H_2O_2 (1 ml/min et durée d'ajout d'une heure ou 0,5 ml/min et durée d'ajout de 2h) mais également l'influence du ratio d' H_2O_2 introduit associé au débit sur la reproductibilité, les résultats figurent dans le tableau 4.

EPS HYD 657	R(H_2O_2 /EPS)	Durée d'ajout	M_w (g/mol)	Reproductibilité
Essai 1	0,1	1h	40-130 000	Mauvaise
Essai 2		2h	40 000	Bonne
Essai 3	0,2	1h	20-50 000	Mauvaise
Essai 4		2h	20 000	Bonne
Essai 5	0,4	1h	10-20 000	Bonne
Essai 6		2h	10 000	Bonne

Tableau 4 : Reproductibilité des manipulations en fonction du débit d'ajout et du ratio final en H_2O_2 .

Pour les ratios les plus faibles en H_2O_2 (essais 1 à 4) nous avons vérifié qu'un débit plus lent (essais 2 et 4) permettait une meilleure efficacité de la dépolymérisation et une meilleure

reproductibilité de celle-ci. La quantité d'hydroxyles disponibles à un instant t est probablement moins importante et permet alors une dépolymérisation mieux contrôlée et donc plus reproductible.

L'amélioration de la dépolymérisation et de sa reproductibilité avec un débit plus lent d'ajout de l' H_2O_2 est plus difficile à percevoir pour des ratios plus importants en H_2O_2 (essais 5 et 6), lorsque les masses molaires finales sont les plus faibles.

e) Importance de la régulation du pH

Lors de la dépolymérisation du polysaccharide par catalyse métallique, une acidification du milieu réactionnelle est observée lors de l'ajout de cuivre (paragraphe 2.1-). Une régulation du pH a donc été réalisée de façon systématique dans les travaux précédemment menés en dépolymérisation. Nous nous sommes interrogés sur l'importance de cette régulation par ajout de soude, et, en particulier, si celle-ci n'était pas la source du manque de reproductibilité obtenu, par exemple, lors d'un ajout à débit plus important de l'eau oxygénée. En effet, la formation d'un précipité d'hydroxyde de cuivre, lors de l'ajout de soude diminuerait la quantité de cuivre disponible pour la réaction de dépolymérisation. Des séries de manipulations ont été réalisées pour un débit d'ajout d' H_2O_2 de 1 ml/min et pour différents ratios massiques finaux H_2O_2 /EPS (tableau 5).

Sans régulation de pH			
EPS HYD 657	R(H_2O_2 /EPS)	M_w (g/mol)	Reproductibilité
Essai 1	0,1	60-100 000	Non
Essai 2	0,2	45-100 000	Non
Essai 3	0,4	20 000	Oui
Avec régulation de pH			
EPS HYD 657	R(H_2O_2 /EPS)	M_w (g/mol)	Reproductibilité
Essai 4	0,1	40- 130 000	Non
Essai 5	0,2	20- 50 000	Non
Essai 6	0,4	10- 20 000	Oui

Tableau 5 : Evolution de la masse molaire en masse et de la reproductibilité des manipulations après dépolymérisations réalisées avec ou sans régulation de pH et pour différents ratios H_2O_2 /EPS.

L'absence de régulation du pH ne permet pas d'améliorer la reproductibilité des manipulations pour des débits plus élevés d'ajout d' H_2O_2 (essais 4 et 5). Tout au contraire, l'efficacité de la dépolymérisation observée est moins bonne.

Des expériences ont également été réalisées pour R(H_2O_2 /EPS) égal à 0,2 avec un débit plus faible d'ajout d' H_2O_2 (0,5 ml/min), là encore, une moins bonne efficacité et une mauvaise reproductibilités ont été observées en l'absence de régulation du pH.

Ainsi, pour le plus faible débit d'ajout d' H_2O_2 testés (0,5 ml/min), et lorsque le cuivre est utilisé comme catalyseur de la réaction, la régulation du pH apparaît donc être un facteur important pour obtenir une bonne efficacité et une bonne reproductibilité des manipulations. Pour un débit plus important, si cette régulation ne permet pas d'améliorer les problèmes de reproductibilité rencontrés elle permet, néanmoins, d'obtenir une meilleure efficacité dans la dépolymérisation (essais 1 et 2) .

La régulation du pH lors des manipulations réalisées avec ajout de cuivre a donc été poursuivie.

Ces études ont donc permis la mise en place de conditions :

- La réaction ne peut pas être menée de façon efficace et reproductible à température ambiante. Les manipulations seront donc réalisées à 50°C ;
- Pour être stables dans le temps, les échantillons doivent être obligatoirement réduits en fin de manipulation ;
- La quantité d'H₂O₂ introduite permet de contrôler facilement le degré de dépolymérisation;
- Un débit d'ajout plus lent du H₂O₂ permet une amélioration de la reproductibilité et de l'efficacité de la dépolymérisation d'autant plus perceptible que le ratio ajouté en H₂O₂ est faible ;
- En présence de cuivre, la régulation du pH est un facteur essentiel à l'efficacité et à la reproductibilité de la manipulation.

Nous nous sommes intéressés par la suite aux conditions d'ajout du métal.

4.4- Importance du métal lors de la dépolymérisation

Dans la littérature, l'utilisation du cuivre, ou encore du fer, lors de la dépolymérisation par catalyse métallique de polysaccharides est quasi-systématique. Si les auteurs font référence à la possibilité d'utilisation d'autres métaux, aucun résultat expérimental n'a été trouvé lors de nos recherches bibliographiques. L'utilisation d'autres métaux nous paraissait intéressante pour deux raisons principales. D'une part, il est dit dans la littérature que le choix du métal peut permettre d'obtenir une certaine sélectivité dans les sites de clivage [35]. D'autre part la chélation de métaux induite par les polysaccharides peut participer à l'activité biologique de l'EPS après dépolymérisation. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement à l'utilisation de deux autres métaux présentant une activité biologique intéressante en cosmétique et permettant ainsi de tirer partie de la pollution par les métaux : le zinc et le manganèse. Le cuivre et le zinc sont connus pour être parmi les substances les plus efficaces pour lutter contre les dommages causés par les réactions radicalaires [36]. De plus, le zinc présente des activités séborégulatrices et anti-inflammatoires et le manganèse est utilisé dans les produits anti-âge où il permet aux cellules de se protéger de l'apoptose [37].

a) Phénomènes de chélation

Les polysaccharides sont reconnus pour pouvoir fixer des métaux lourds. A titre d'exemple, certains polysaccharides d'origine microbienne peuvent d'ailleurs être utilisés pour épurer des effluents chargés en métaux lourds [38].

Les fonctions carboxyliques (et les fonctions amides lorsqu'il y en a) sont les principales fonctions responsables de la chélation des métaux [39] mais d'autres fonctions pourraient intervenir dans la formation de complexes comme les fonctions alcools (figure 16).

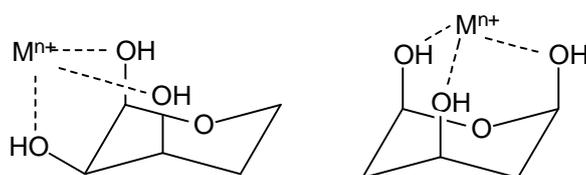


Figure 16: Intervention des fonctions alcools lors de la chélation des métaux

Ces propriétés chélatantes peuvent faire intervenir deux ou plusieurs atomes d'oxygène appartenant aux résidus adjacents sur une même chaîne polymérique (figure 17) voire même des groupes (hydroxyles, carboxyles...) appartenant à différentes chaînes polysaccharidiques [40,41]. Ceci conduit à des modifications parfois importantes des propriétés macroscopiques des polysaccharides en présence de quantités même minimes de cations métalliques polyvalents. Ainsi, la formation de complexes métal-exopolysaccharide implique très certainement des réarrangements structurels et conformationnels du polysaccharide.

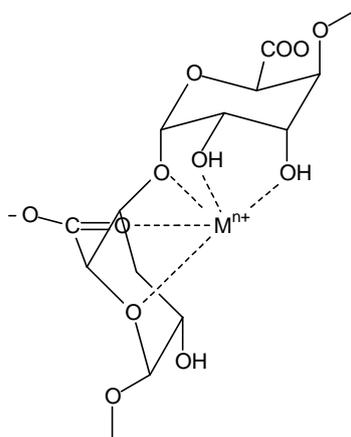


Figure 17: Participation des résidus adjacents lors de la chélation des métaux

La complexation et la force des liaisons sont également dépendantes de la nature des cations. D'un point de vue général, les cations univalents forment tous des complexes faibles, les divalents des complexes plus forts et enfin les trivalents forment les complexes les plus forts. Le rayon ionique des ions est crucial, la complexation par les polysaccharides anioniques est favorisée par des cations à large rayon ionique [42]. Les complexes métal-carbohydrate les plus stables sont formés par des cations de rayon ionique compris entre 100 et 110 pm.

Les résultats des études de biosorption réalisées lors des travaux de thèse de Martine Loaëc [43], obtenus en système fermé et à un seul métal, montrent que les exopolysaccharides étudiés ont des propriétés de rétention vis à vis de différents métaux (notamment Zn^{2+} qui possède un rayon ionique de 74 ppm très proche de celui de Cu^{2+} de 72 ppm) de l'ordre de 10% en masse.

Après la dépolymérisation de l'EPS HYD 657 par le cuivre, le manganèse et le zinc suivie d'une ultrafiltration, nous avons dosé les métaux résiduels correspondants (tableau 6).

HYD 657	Métal	M_w (g/mol)	% initial de métal ajouté par rapport à l'EPS	% dosé après dépolymérisation et lyophilisation
Essai 1	Cu	20 600	13	3,1
Essai 2		30 000	22	5,4
Essai 3		20 000	33	4,4
Essai 4	Zn	21 500	13	2,6
Essai 5	Mn	40 000	16	4,1
Essai 6		50 000	16	4,3

Tableau 6: Métaux résiduels après dépolymérisation de 200 mg d'EPS HYD 657, avec un ratio en H_2O_2 de 0,2 avec du cuivre, du zinc ou du manganèse

Quelles que soient la quantité initiale et la nature du métal introduit, le pourcentage obtenu après dépolymérisation et ultrafiltration est compris entre 2,5 et 5,5% de la matière sèche. La rétention observée entre les différents métaux semble donc équivalente.

Deux formes de métaux doivent, très probablement, être distinguées lors de ces dosages : le métal libre (Cu^{2+} , Zn^{2+} ou Mn^{2+}) et le métal séquestré encore sous forme de sels métalliques.

b) Influence du contre-ion

Par rapport aux manipulations réalisées par l'Ifremer avec d'autres EPS, l'acétate de cuivre a été remplacé par le sulfate de cuivre afin d'homogénéiser le contre ion utilisé pour les différents métaux.

Les mêmes manipulations ont été réalisées pour le sulfate de cuivre et l'acétate de cuivre dans les conditions optimisées précédemment. Des masses molaires similaires ont été obtenues. Une faible influence du contre ion sur la dépolymérisation semble donc mise en évidence

c) Influence de la quantité de métal disponible

Plusieurs facteurs peuvent intervenir sur la quantité de métal disponible : la chélation, la quantité introduite initialement ou encore, le protocole d'ajout du cation.

L'ajustement du pH en début de réaction lors de la dépolymérisation par catalyse métallique est effectué lorsque le pH est stabilisé, soit après environ 10 minutes, par exemple. Néanmoins après 10 minutes sous agitation, l'équilibre de biosorption n'est pas réellement atteint. Ainsi, des expériences ont été réalisées avec le sulfate de cuivre pour un ratio en H_2O_2 de 0,4 en ajustant le pH 24h après avoir ajouté le métal. La détermination des masses molaires a montré, avec une bonne reproductibilité, une moins bonne dépolymérisation. La M_w est, en effet, alors égale à 40 000 g/mol et est donc deux fois plus importante que celle observée lorsque la réaction démarre 10 minutes après l'ajout de métal. Il semble donc que lorsque l'équilibre de biosorption est réellement atteint, la quantité de cuivre disponible pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène est moins importante entraînant une moins bonne dépolymérisation.

Des manipulations ont été réalisées avec des ajouts continus d' H_2O_2 et du métal (cuivre) en solution aqueuse. L'ajout continu du métal visait à réduire le phénomène de chélation et à améliorer ainsi la quantité de métal disponible pour former des radicaux hydroxyles et améliorer l'efficacité de la dépolymérisation. Les résultats obtenus se sont avérés non reproductibles avec des M_w comprises entre 5000 et 40 000 g/mol pour un ratio massique final de 0,2 en H_2O_2 ajouté à un faible débit ($9,8 \cdot 10^{-3}$ mmol/min d' H_2O_2).

La quantité de métal ajoutée avait été initialement fixée en fonction des études précédentes déjà décrites. Les études préliminaires ne semblaient pas montrer d'avantages à l'utilisation de quantités plus importantes en cuivre. De nouvelles études d'optimisation ont été réalisées (figure 18) : pour deux ratios en H_2O_2 , des quantités croissantes en cuivre ont été ajoutées.

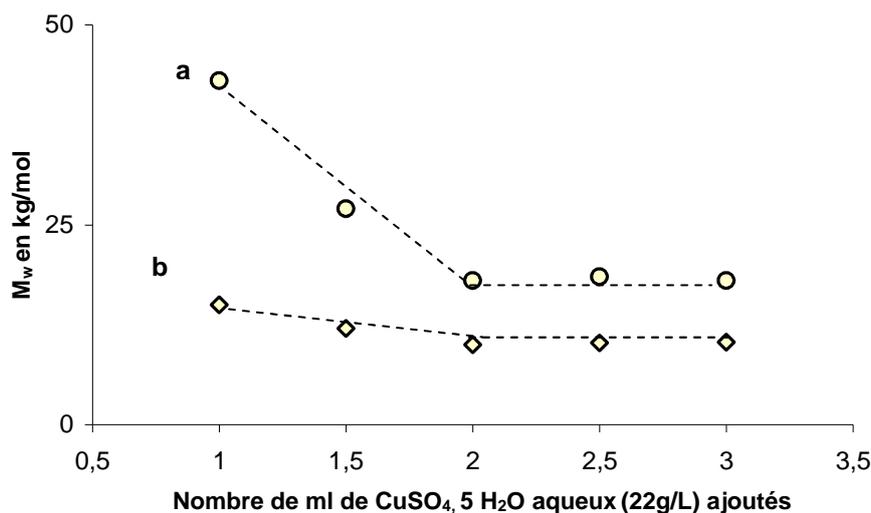


Figure 18 : Evolution de la masse molaire en fonction de la concentration en Cu^{2+} pour des ratios en H_2O_2 de 0,2 (a) et 0,4 (b).

Cette étude a montré que pour un ajout de 2 ml de $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ (22g/L), soit un ratio massique de 22% par rapport à l'EPS, le système est saturé en cuivre et l'augmentation de la quantité de Cu^{2+} ne permet plus d'améliorer la dépolymérisation. En effet, le polymère et la réaction de Fenton avec H_2O_2 sont alors saturés par le métal ce qui n'est pas le cas au niveau des pentes observées avant l'ajout de 2 ml sur la figure 18. La quantité de cuivre initialement choisie par rapport à des études antérieures se révèle également judicieuse dans le cas de l'EPS HYD 657.

d) Résultats de dépolymérisation en fonction de la nature du métal utilisé

Les premiers essais ont été réalisés en substituant le sulfate de cuivre par du sulfate de manganèse ou le sulfate de zinc dans les conditions précédemment optimisées, c'est à dire : régulation du pH à 7, température à 50°C , ajout de la même quantité molaire en métal (0,18 mmol). Les manipulations ont été réalisées une dizaine de fois pour chaque métal permettant de calculer l'écart type pour chaque manipulation. Les résultats figurent dans le tableau 7.

HYD 657	Métal	R($\text{H}_2\text{O}_2/\text{EPS}$)	M_w (g/mol)	Reproductibilité	Ecart type
Essai 1	$\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4	7 500- 322 000 $\overline{M_w} = 85 700$	Non	18 800
Essai 2	$\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	0,4	5 000- 540 000 $\overline{M_w} = 198 500$	Non	62 700
Essai 3	$\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$	0,4	10 000	Oui	1 100

Tableau 7: Comparaison des M_w obtenus par dépolymérisation pour différents métaux et dans les mêmes conditions opératoires (régulation du pH à 7, température à 50°C , ajout de la même quantité molaire en métal soit 0,18 mmol).

Les résultats obtenus montrent la capacité de ces trois métaux à dépolymériser l'EPS HYD 657 mais avec une moins bonne efficacité et surtout une mauvaise reproductibilité pour les manipulations réalisées en présence de zinc ou de manganèse (essais 1 et 2) par rapport à celles obtenues avec le cuivre (essai 3).

Pour des échantillons dépolymérisés par chacun de ces 3 métaux possédant des masses molaires voisines de 20 000 g/mol, obtenus de façon non reproductible dans le cas du zinc et du manganèse, la composition en monosaccharides a été déterminée par CPG (tableau 8).

Métal	Rha %	Fuc %	Gal %	Glc %	Man %	GlcA %	GalA %	M _w (kDa)	I _p
Natif	3,4	1,8	21,7	12,3	1,8	6,1	7,3	3000	-
Cu	2,7	1,9	15,5	9,5	2,1	2,6	7,1	20	2,4
Zn	2,8	1,5	17,7	9,8	1,3	4,8	7,3	21,5	4,8
Mn	2,3	1,3	18,0	9,0	1,8	4,5	7,4	25	nd*

Tableau 8: Composition en monosaccharides obtenue pour 3 métaux après dépolymérisation (R=0,4 pour Zn et Mn et R=0,2 pour Cu). * 3 pics observés en HPSEC

Les évolutions qui sont observées dans la composition osidique sont semblables pour les 3 métaux :

- diminution importante de la quantité en galactose et en acide glucuronique ;
- diminution moins importante des ratios en glucose et rhamnose ;
- absence de modifications dans la composition en acide galacturonique, fucose et mannose.

De plus si nous nous intéressons de plus près aux variations des ratios nous observons que:

- pour le galactose et l'acide glucuronique pour une dépolymérisation réalisée par le zinc ou le manganèse :

$$\frac{\%Gal(\text{natif})}{\%Gal(\text{dépolymérisé})} \approx \frac{\%GlcA(\text{natif})}{\%GlcA(\text{dépolymérisé})} \approx 1,2$$

- pour le rhamnose et le galactose pour une dépolymérisation réalisée par le zinc ou le manganèse :

$$\frac{\%Rha(\text{natif})}{\%Rha(\text{dépolymérisé})} \approx \frac{\%Glc(\text{natif})}{\%Glc(\text{dépolymérisé})} \approx 0,8$$

Ces résultats semblent vérifier les premières hypothèses énoncées lors de l'étude des analyses CPG réalisées après dépolymérisation pour deux ratios d'H₂O₂ en présence de cuivre (tableau 3) : les hydroxyles s'attaqueraient préférentiellement aux liaisons Gal-GlcA et Rha-Glc.

Une diminution plus importante du ratio en acide galacturonique dans le cas du cuivre a été observée (2,6% contre 4,5-4,8% pour les autres métaux). Ainsi, en présence de cuivre, la liaison Gal-GlcA serait plus touchée pour une même masse molaire finale.

Pour les 3 métaux, les mêmes liaisons seraient attaquées par les hydroxyles : aucune sélectivité de clivage de liaisons osidiques en fonction du métal utilisé n'a donc été mise évidence.

Plusieurs paramètres peuvent expliquer la sélectivité a priori observée pour deux liaisons (Glc-Rha et GlcA-Gal) :

- Une coupure plus facile au niveau de la chaîne principale du squelette car les ramifications supposées sont courtes. En effet, les groupements lactates sont toujours identifiables en CPG (mais non quantifiables par cette méthode), ainsi la ramification présentant, d'après l'hypothèse de structure, le groupement lactate et une liaison Gal-GlcA serait, au moins partiellement, préservée.

- L'intervention possible des phénomènes de chélation. Ainsi, en prenant l'exemple de l'évolution de la composition en acides uroniques, seule la quantité d'acides glucuroniques diminue. Or, les expériences menées par Gould et Rankin [44] ont démontré que la constance de stabilité des complexes du calcium (rayon ionique de 99 ppm) formés par le D-glucuronate était plus faible que celle obtenue par le D-galacturonate. Cette différence de force de complexation entre ces deux acides a été mise en relation avec la position différente du groupement hydroxyle en du carbone C4 qui est axial pour le D-galacturonate et équatorial pour le D-glucuronate (figure 19) [45].

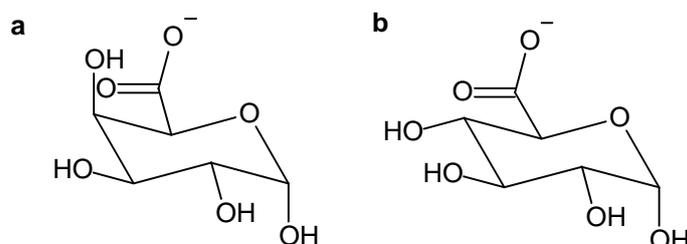


Figure 19 : (a) D-galacturonate (b) D-glucuronate

Ainsi, les phénomènes de chélation pourraient expliquer une plus grande réactivité de l'acide glucuronique par rapport à l'acide galacturonique. En effet, l'acide glucuronique complexerait de manière moins forte les métaux et serait donc plus enclin à réagir que l'acide galacturonique.

Ces premières hypothèses devront être vérifiées par des études plus poussées réalisées en RMN.

Les premières manipulations avaient été réalisées avec une régulation du pH. La régulation du pH s'est avérée plus difficile dans le cas du zinc et du manganèse que pour le cuivre avec l'apparition de façon aléatoire de précipités, notamment dans le cas du manganèse. Le diagramme potentiel-pH du manganèse est complexe et les espèces pouvant se former sont nombreuses notamment lorsque le pH augmente. La précipitation « aléatoire » des métaux doit affecter la reproductibilité et l'efficacité des manipulations puisque la quantité « disponible » en métal s'en trouve diminuée sans moyen de la quantifier. De nouvelles études ont donc été réalisées sans régulation du pH (tableau 9).

Métal	R(H ₂ O ₂ /EPS)	M _w (g/mol)	Reproductibilité	Ecart type	pH	
					initial	Final
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,4	15 200- 25 500 M _w (moyenne) = 20 800	Oui	2140	4,4	4
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	0,4	98 400- 132 200 M _w (moyenne) = 111 350	Oui	6900	6	5,2
MnSO ₄ , H ₂ O	0,4	40 000-338 600 M _w (moyenne) = 187 100	Non	50 700	6,3	4,5 –6

Tableau 9 : Comparaison des M_w obtenus par dépolymérisation pour différents métaux et dans les mêmes conditions opératoires (pas de régulation de pH, température à 50°C, ajout de la même quantité molaire en métal soit 0,18 mmol).

Aucune amélioration n'a été observée en l'absence de régulation du pH dans le cas de l'ajout de manganèse : la masse molaire et l'écart type restent semblables à ce qui avait été trouvé précédemment. Le suivi du pH réalisé pendant les manipulations a montré une mauvaise

reproductibilité avec des valeurs finales de pH comprises entre 4,5 et 6. La complexité du diagramme potentiel-pH rend la réaction de dépolymérisation difficile à contrôler et même aléatoire dans le cas de l'ajout de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Par contre, l'absence de régulation de pH a permis d'obtenir des résultats beaucoup plus reproductibles (écart type de 6900 contre 18 800 lorsque le pH était amené à neutralité) dans le cas de l'ajout de zinc. L'efficacité de la dépolymérisation reste bien inférieure à celle du cuivre avec des masses molaires d'environ 110 000 g/mol contre 20 000 g/mol, dans les mêmes conditions, lors de l'ajout de cuivre. Le suivi de l'évolution du pH témoigne également de la reproductibilité de la manipulation. L'absence de régulation du pH permet très probablement d'éviter la formation du précipité $\text{Zn}(\text{OH})_2$ qui devait jouer sur la reproductibilité de nos résultats précédents. Les cinétiques de dépolymérisation ont été comparées avec celles obtenues dans les mêmes conditions ($R=0,4$, durée de réaction fixée à 2h, absence de régulation de pH) pour l'ajout de cuivre (figure 20).

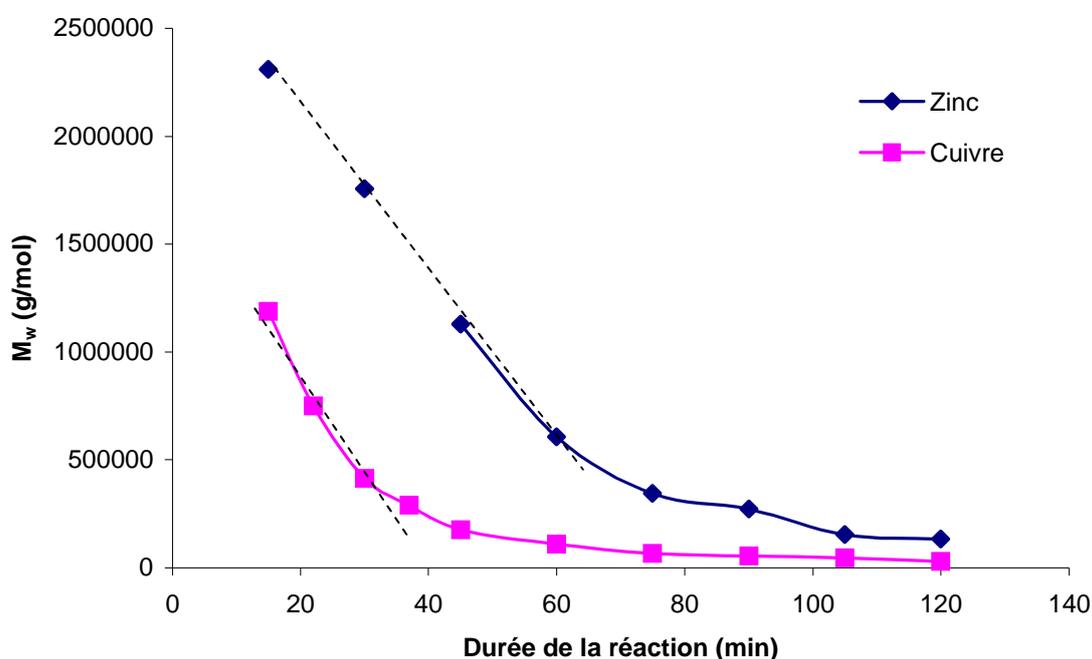


Figure 20 : Evolution de la masse molaire M_w en fonction du temps de réaction

Malgré une dépolymérisation bien moins efficace dans le cas du zinc, les cinétiques ont montré des profils de courbes semblables :

- dans la première partie de la courbe, la cinétique de la réaction peut être considérée comme d'ordre 1 jusqu'à une masse molaire moyenne voisine de 150-100 000 g/mol atteinte après environ 45 minutes dans le cas du cuivre et 70 minutes pour le zinc;
- Dans une deuxième partie de courbe, la diminution de la masse molaire est beaucoup moins importante et tend vers un palier.

Ces résultats ont été également vérifiés par un suivi de l'évolution de la viscosité (figure 21).

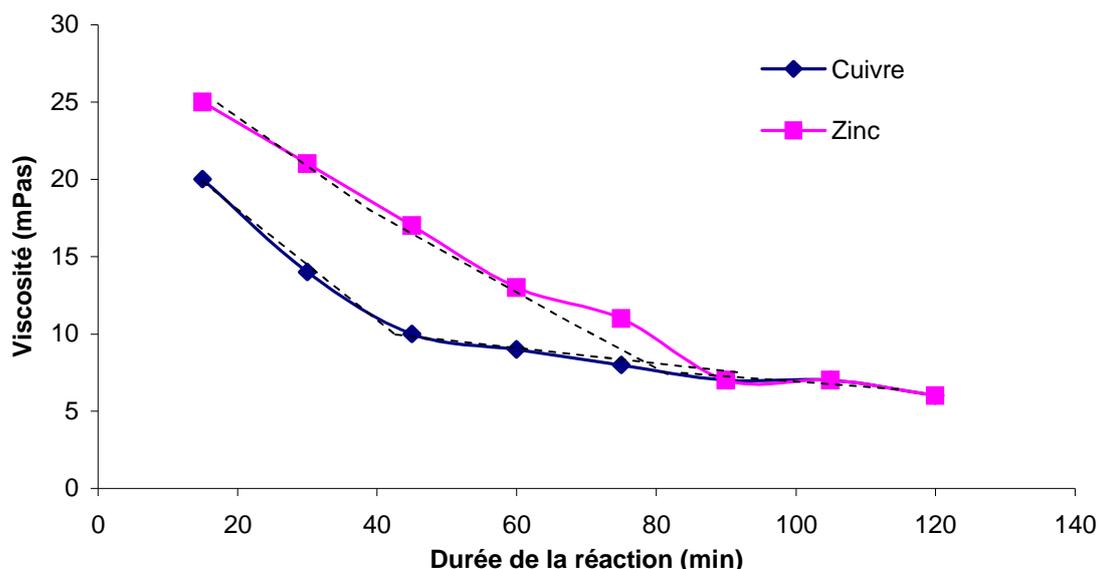


Figure 21 : Evolution de la viscosité en fonction du temps de réaction

Par la suite nous avons souhaité étudier les possibilités de synergies entre les différents métaux. De nouvelles manipulations ont été réalisées pour des mélanges équimolaires Cu-Zn et Cu-Mn avec une même quantité molaire totale en métal (0,18 mmol) pour différents ratios en H₂O₂ et avec ou sans régulation de pH. L'ensemble des résultats est synthétisé dans le tableau 10.

Métal (0,18 mmol)	R(H ₂ O ₂ /EPS)	pH control	M _w (g/mol)	I (Mw/Mn)
Cu+ « Cu »	0,1	Oui	35 000	2,0
	0,2	Oui	20 000	2,4
	0,4	Oui	10 000	2,5
	0,1	Non	60-100 000	-
	0,2	Non	45-100 000	-
	0,4	Non	20 000	2,5
Cu+Zn	0,1	Oui	45 000	2,8
	0,2	Oui	25 000	-
	0,4	Oui	10 000	2,2
	0,2	Non	75-100 000	-
	0,4	Non	25-30 000	-
Cu+Mn	0,4	Oui	50-70 000	-
	0,2	Non	10 000	2,2
	0,4	Non	<10 000	2

Tableau 10: Comparaison des masses molaires obtenues après dépolymérisation avec du cuivre seul, un mélange Cu-Zn ou un mélange Cu-Mn pour différentes conditions (ratios en H₂O₂, contrôle du pH).

Les masses molaires obtenues dans le cas des mélanges Cu-Zn et Cu-Mn sont similaires à celles obtenues seulement en présence de cuivre mais ne sont pas seulement dues à la présence de cuivre. En effet, les mêmes manipulations ont été réalisées (tableau 11), avec une régulation du pH, avec la même quantité de cuivre introduite dans les mélanges (0,9 mmol): la dépolymérisation observée est

moins importante notamment pour les ratios les plus faibles de 0,2 et 0,4. Nous pouvons donc conclure qu'il y a bien un effet synergie du mélange de métal sur la dépolymérisation.

Métal	R(H ₂ O ₂ /EPS)	M _w (g/mol)	I _p
Cu 0,09 mmol	0,1	55 000	2,3
	0,2	45 000	2,1
	0,4	15 000	2,6
Cu 0,18 mmol	0,1	35 000	2,0
	0,2	20 000	2,4
	0,4	10 000	2,5

Tableau 11: Evolution de la masse molaire en fonction de la quantité de cuivre pour différents ratios d'H₂O₂

Dans le cas du mélange Cu-Zn, la reproductibilité et l'efficacité de la dépolymérisation nécessitent une régulation du pH. Dans ces conditions, les résultats sont proches de ceux obtenus avec la même quantité de cuivre. Les phénomènes de chélation observés doivent être très proches. En effet, les rayons ioniques des dications Cu²⁺ et Zn²⁺ sont quasi égaux (respectivement 72 et 74 ppm). Les phénomènes de chélation peuvent, peut être, expliquer des résultats similaires lors de l'ajout simultané de cuivre et de zinc. L'analyse glycosidique par CPG d'un échantillon dépolymérisé par le mélange Cu-Zn avec régulation du pH figure dans le tableau 12.

Métal	R(H ₂ O ₂ /EPS)	M _w (kDa)	I _p	Rha %	Fuc %	Gal %	Glc %	Man %	GlcA %	GalA %
Aucun (Natif)	-	3000	-	3,4	1,8	21,7	12,3	1,8	6,1	7,3
Cu	0,2	20	2,4	2,7	1,9	15,5	9,5	2,1	2,6	7,1
Zn	0,4	21,5	4,8	2,8	1,5	17,7	9,8	1,3	4,8	7,3
Cu+Zn	0,1	45	3	3,0	1,3	13	9,0	1,8	6,7	7,7
Cu+Zn	0,4	12,5	2,6	3,2	1,4	14,4	9,2	1,8	6,8	7,5

Tableau 12: Composition en monosaccharides obtenue pour des échantillons dépolymérisés avec un mélange Cu-Zn

Les modifications de la composition observées après dépolymérisation par un mélange Cu-Zn sont différentes de celles obtenues précédemment pour le cuivre seul ou le zinc seul : si une diminution des ratios en galactoses et en glucoses est également observée, aucun changement au niveau de la composition en acide glucuronique n'a pu être mis en évidence et ceci de façon reproductible.

Des cinétiques ont, de nouveau, été réalisées et comparées (figure 22) à celles obtenues pour chacun des deux métaux seuls. Le même profil de courbe est toujours obtenu mais on note une amélioration de la cinétique dans les premières minutes de la réaction pour le mélange cuivre et zinc.

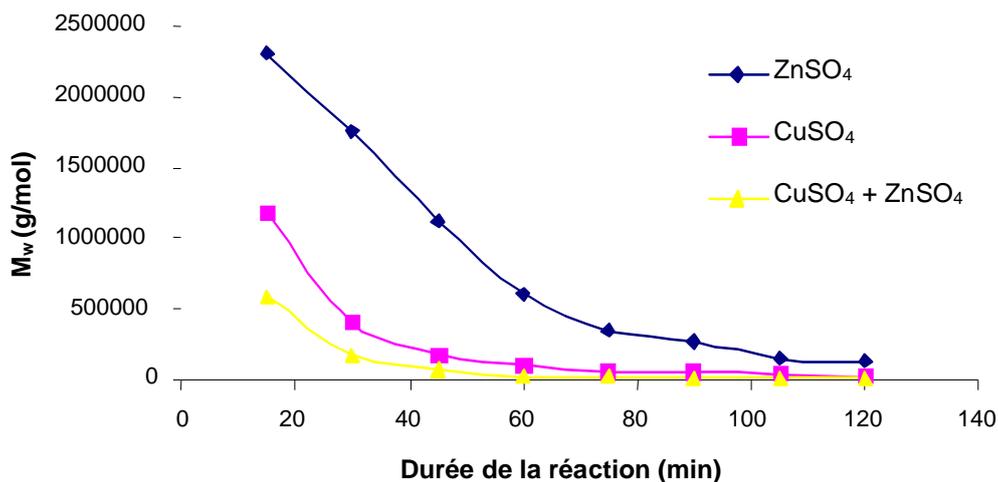


Figure 22 : Cinétiques de dépolymérisation obtenues dans les mêmes conditions pour l'ajout de cuivre seul, de zinc seul ou du mélange cuivre et zinc.

Métal	M _w (g/mol)	% initial de métal ajouté par rapport à l'EPS	% dosé après dépolymérisation et lyophilisation
Cu	25 500	22	2,9
Zn	21 500	13	2,6
Cu + Zn	12 700	11 en Cu	2,2 en Cu
		13 en Zn	2,6 en Zn

Tableau 13 : Métaux résiduels après dépolymérisation de 200 mg d'EPS avec un ratio en H₂O₂ de 0,4 avec du cuivre, du zinc ou un mélange Cu-Zn.

Dans le tableau 13, on observe que l'ajout d'un mélange de métaux ne modifie pas la chélation observée pour chacun des métaux bien que chaque métal soit en quantité initiale moins importante et qu'il doive partager les sites de chélation avec un autre métal. Ces résultats semblent confirmer, que deux formes de métaux doivent être distingués lors de ces dosages : le métal libre (Cu²⁺, Zn²⁺) chélaté et le métal séquestré qui se trouve encore sous forme de sels métalliques.

Dans le cas du mélange Cu-Mn, les mêmes phénomènes de précipitations aléatoires du manganèse que ceux obtenus pour les manipulations réalisées avec du manganèse seul ont été observés. Par contre, lors de ces manipulations, l'absence de régulation de pH permet d'avoir une bonne reproductibilité et une dépolymérisation plus efficace que celle obtenue avec le cuivre seul.

Devant l'amélioration des résultats obtenus lors de l'ajout de manganèse en présence de cuivre, nous nous sommes demandés si l'acidité apportée par le cuivre ne permettait pas l'amélioration observée. De nouvelles études ont donc été réalisées pour le manganèse seul à pH acide. Le pH a été amené à 5, valeur obtenue après ajout de 0,09 mmol de cuivre, par ajout d'acide. Le pH acide n'a apporté aucune amélioration à la reproductibilité de la dépolymérisation : l'écart type est toujours trop important ($\sigma = 27\,200$) pour considérer les manipulations comme reproductibles. Par contre, l'efficacité est améliorée avec une masse molaire moyenne finale divisée par 2,5 ($M_w = 72\,700$ g/mol) par rapport à celle obtenue à un pH de 6,5.

4.5- Premier transfert du protocole de dépolymérisation par catalyse métallique

Jusqu'ici l'ensemble des études présentées ont été réalisées sur de petites quantités d'EPS fixées à 200 mg. Néanmoins, il faut rappeler que pour les fucanes, autres polysaccharides étudiés par l'Ifremer, ce type de transferts d'échelle avait déjà été réalisé avec succès. Une première extension d'échelle a été réalisée sur 2g d'EPS HYD 657 dans un réacteur double enveloppe de 2 litres (figure 23). Lors de cette manipulation, un ratio massique final de 0,4 en H₂O₂/EPS a été ajouté et une régulation de pH a été réalisée pendant la manipulation.



Figure 23 : Montage utilisé lors d'un premier transfert du protocole de dépolymérisation par catalyse métallique sur 2g d'EPS.

Le rendement final après ultrafiltration est de 65%. Les résultats des analyses HPSEC figurent dans le tableau 14.

Echelle	M_p	M_w	M_n	I_p
200 mg	8760	10 500	4000	2,6
2g	13 300	40 400	12700	3,2

Tableau 14 : Comparaison des résultats d'analyses HPSEC pour une dépolymérisation réalisée dans les mêmes conditions (CuSO₄, R=0,4 et pH régulé) pour des quantités différentes d'EPS.

Les premiers résultats montrent des masses molaires moyennes plus élevées que celles qui avaient été obtenues pour un même rapport H₂O₂/EPS. Un changement d'échelle demande une réadaptation des différents paramètres classiques déjà étudiés (débit d'H₂O₂/EPS et donc temps de réaction, quantité de cuivre, ratio H₂O₂/EPS). Les influences de la géométrie du réacteur et de l'agitation du milieu réactionnel devront également être vérifiées. Cette nouvelle mise au point sera envisagée à partir des fractions présentant une activité biologique intéressante.

5- Conclusions et perspectives

Les objectifs visés pour la voie de dépolymérisation par catalyse métallique ont été remplis, à savoir obtenir des échantillons variés en tailles, de façon reproductible.

Les problèmes de reproductibilité observés dans les expériences préliminaires nous ont contraint à abandonner les plans d'expériences initialement prévus. La détermination des facteurs influents (ratio en H_2O_2 , débit d'ajout d' H_2O_2 , pH, métal utilisé) a permis un contrôle de la dépolymérisation, en particulier de son efficacité et de sa reproductibilité. De plus, des métaux n'ayant pas fait l'objet d'études dans la littérature, le zinc et le manganèse, ont été utilisés. Ainsi, des échantillons variés de masses molaires comprises entre 5000 et 100 000 g/mol ont été obtenus.

Les mécanismes mis en jeu lors des réactions de dépolymérisation radicalaires sont complexes. Les modifications de la composition chimique observées ont permis de dresser des premières hypothèses sur les sites de rupture du polymère.

Une extension d'échelle pour les échantillons ayant montré une activité biologique intéressante pourrait être réalisée en collaboration avec l'IUT de Saint Nazaire possédant un réacteur de grande capacité (30 l). Cette extension d'échelle nécessitera probablement une nouvelle optimisation des paramètres, simplifiée par la mise en évidence des paramètres les plus influents lors de cette étude.

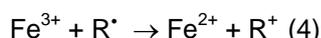
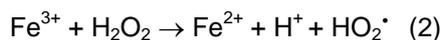
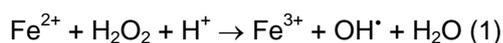
Il a également paru intéressant d'ouvrir de nouvelles perspectives avec l'étude prospective d'une nouvelle voie de dépolymérisation chimique de l'EPS HYD 657.

6- Etude prospective d'une nouvelle voie de dépolymérisation de l'HYD 657 par électrochimie

Suite aux résultats obtenus en catalyse métallique, nous avons souhaité nous intéresser à une autre voie de dépolymérisation radicalaire : l'électrochimie. A notre connaissance cette voie n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études dans le domaine de la dépolymérisation de polysaccharides pourtant son extension à grande échelle paraît facilement réalisable. Une étude prospective a donc été réalisée en collaboration avec le Dr Jean-Pierre Hurvois de l'UMR CNRS 6509 « Organométalliques et catalyse, Chimie et Electrochimie Molaires » de l'Université de Rennes 1. Les conditions de cette étude prospective se sont inspirées des travaux de Harris et al [46]. Nous souhaitons, dans un premier temps, vérifier la faisabilité de la dépolymérisation de l'EPS HYD 657 par la voie électrochimique et, le cas échéant, ouvrir ainsi de nouvelles perspectives de modifications.

6.1- La voie électrochimique en dépolymérisation dans la littérature

Cette voie n'a, à notre connaissance, pas fait l'objet de beaucoup d'études concernant la dépolymérisation « propre » de polysaccharides. C'est un moyen plus couramment utilisé pour la dépollution de polluants organiques et inorganiques d'effluent industriels par une réaction dite d'électro-Fenton [47,48]. Cette réaction d'électro-Fenton est réalisée avec une anode conventionnelle. Le pouvoir oxydant de l' H_2O_2 formé est augmenté par l'addition de métal tels que Fe^{2+} ou Cu^{2+} : OH^{\bullet} est alors généré par une réaction classique de Fenton (1), réaction qui a été développée dans la partie précédente. Le métal est ensuite régénéré par sa réduction par H_2O_2 (2), avec le radical hydroperoxyl (3) et/ou avec un intermédiaire radicalaire organique R^{\bullet} (4).

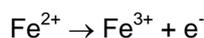


Les résultats obtenus dépendent des différentes concentrations en réactifs, du potentiel et des électrodes utilisées. Cette voie de formation de radicaux hydroxyles semble pouvoir être adaptée à la dépolymérisation de polysaccharides.

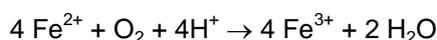
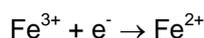
Harris et Herp [46] se sont intéressés à la dépolymérisation des acides alginique et ascorbique par les radicaux libres en présence d'acide ascorbique et de métal. La dépolymérisation est également réalisée à partir du cycle de réduction et d'autoxydation des ions ferriques. Deux compartiments reliés par un pont agar sont utilisés : le fonctionnement est similaire à celui d'une pile (figure 24).

Les mécanismes induits dans chaque compartiment peuvent s'écrire ainsi:

A la cathode :



A l'anode :



Lors de l'électrolyse de l'eau oxygénée est formée, celle-ci réagit selon une réaction de type Fenton pour former des radicaux hydroxyles entraînant la cassure de liaisons glycosidiques comme nous l'avons vue précédemment. Un montage à un compartiment a, part la suite, été utilisé par la même équipe de recherche [47].

Beaucoup de pistes semblent encore inexplorées concernant cette voie de dépolymérisation.

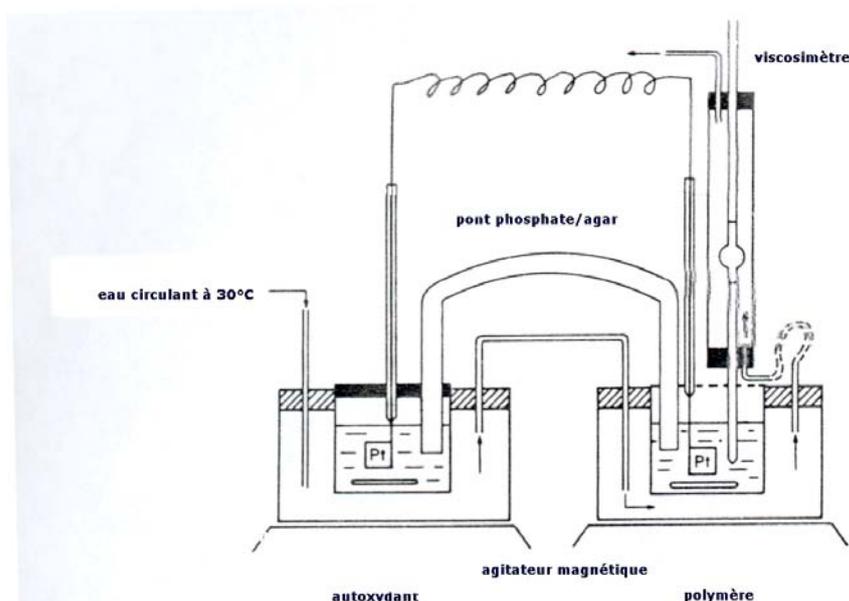


Figure 24 : Montage électrolytique à deux compartiments pour la dépolymérisation de polysaccharides [46]

6.2- Matériel et méthodes générales de caractérisation

Ces travaux de thèse ont été réalisés sur le lot industriel LCO 105 C1 de l'HYD 657.

a) Montage électrolytique

Une cellule classique à 3 électrodes a été utilisée comprenant :

- une électrode de travail en carbone vitreux ;
- une contre électrode en graphite servant à fermer le circuit d'électrolyse ;
- une électrode de référence au calomel saturé (ECS), isolée de la solution par une jonction électrolytique.

L'appareil utilisé est un potentiostat à balayage permettant de faire varier linéairement le potentiel d'une électrode de travail entre deux bornes. Un intégrateur permet de suivre la quantité de courant passant dans le système.

L'EPS est préalablement mis en solution dans un tampon phosphate (0,2N ou 0,02N) à un pH de 7,2.

b) Les techniques d'analyses

- Détermination de la masse molaire

Les masses molaires ont été déterminées à l'ENSCR par HPSEC. Afin de réaliser des cinétiques en temps réel sans craindre des problèmes de dégradation des échantillons, les échantillons analysés n'ont pas été préalablement purifiés. Un pic de sels très proches de celui du polymère a été observé empêchant le calcul des M_w , M_n et I_p .

- Analyses Zêtasizer

Des analyses de tailles par diffusion dynamique de la lumière réalisées avec un Zêtasizer ont permis de mettre en évidence l'évolution de la conformation de l'EPS mis en solution.

- Analyses infrarouges

Des analyses infrarouges ont permis de voir simplement et rapidement si les différentes bandes d'absorption étaient conservées après électrolyse.

- Réalisation de polarogrammes sur mercure :

Les analyses par polarographie sur mercure ont été réalisées avec un polarographe Metrohm 626 avec mesure continue du courant.

La cellule comprend :

- Une électrode de travail à goutte de mercure tombante
- Une contre électrode (carbone)
- Une électrode de référence (ECS)

La vitesse de balayage a été fixée à 5mV/s dans un domaine de mesure compris entre +0,1V et -2V par rapport à l'électrode de référence.

Cette technique permet de caractériser rapidement et de façon précise les espèces mises en jeu dans un système. En effet, une substance donnée est en principe caractérisée par son potentiel de demi-vague dans des conditions expérimentales bien précises (nature de l'électrode, pH du milieu, présence ou absence de complexants...). Ainsi, la hauteur du palier de diffusion des vagues obtenues

est proportionnelle à la concentration de l'espèce tandis que le potentiel de demi palier est caractéristique de cette espèce.

L'électrode de mercure possède certains avantages : elle offre la possibilité de travailler dans un large domaine de potentiel (de + 0,3V à -2,80V) et sa surface est toujours renouvelée ce qui évite les phénomènes de passivation et de pollution.

- **Analyse sur électrode tournante de carbone vitreux :**

Les électrodes solides ne présentent pas les divers avantages offerts par l'électrode à goutte de mercure mais permettent tout de même des réactions anodiques dans un domaine de potentiel relativement étendu. Des courbes $i = f(E)$ analogues à des polarogrammes classiques sont obtenues en utilisant une électrode tournante à grande vitesse.

Une série de mesures a été réalisée sur une électrode tournante de carbone vitreux afin de déterminer le potentiel le plus efficace pour réaliser l'électrolyse.

6.3- Résultats

a) Polarographies sur mercure

Les mesures sur gouttes de mercure tombantes ont été réalisées tout d'abord avec le tampon phosphate seul puis avec l'EPS mis en solution dans ce tampon (figure 25).

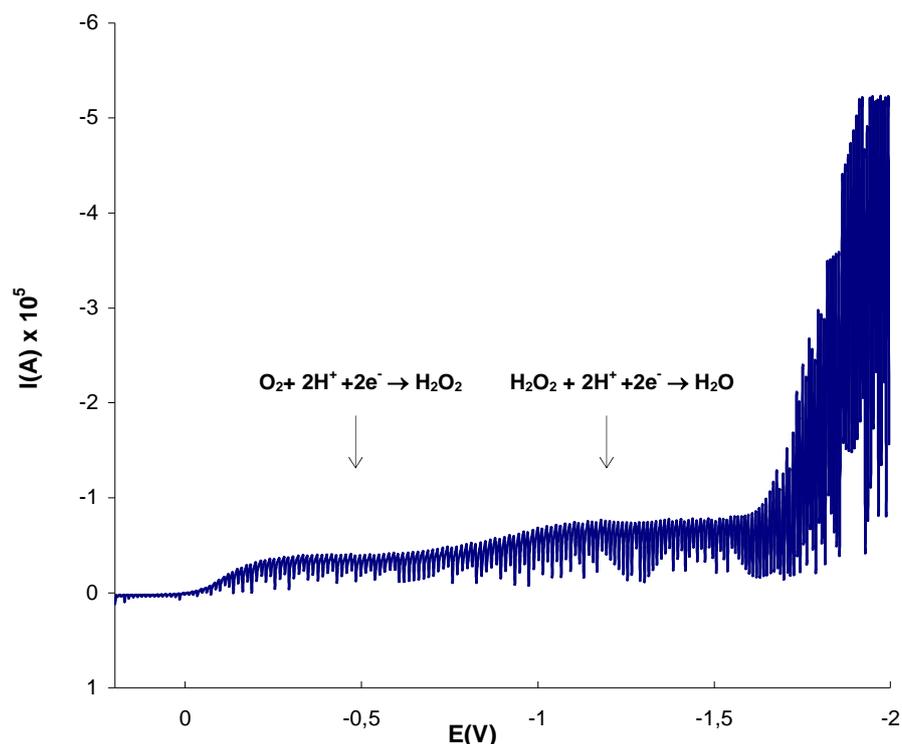


Figure 25 : Polarographie sur mercure de l'EPS dans le tampon phosphate seul

Dans les deux cas deux vagues sont observées :

- une première vers -0,5V par rapport à l'ECS correspondant à la réduction d' O_2 en H_2O_2 avec un potentiel de demi-vague $E_{1/2}(O_2) = 0V/ECS$ dans le tampon phosphate seul;

- la seconde vers $-1,25\text{V}$ par rapport à l'ECS correspondant à la réduction d' H_2O_2 en H_2O avec un potentiel de demi-vague $E_{1/2}(\text{H}_2\text{O}_2) = -0,87\text{V}/\text{ECS}$ dans le tampon phosphate seul.

Lorsque l'EPS est mis en solution dans le tampon phosphate (figure 25), une vague de même hauteur est observée pour O_2 alors que celle relative à la réduction d' H_2O_2 est moins importante.

Après un barbotage d'azote dans les solutions précédentes, les deux vagues disparaissent (figure 26 et 27 a).

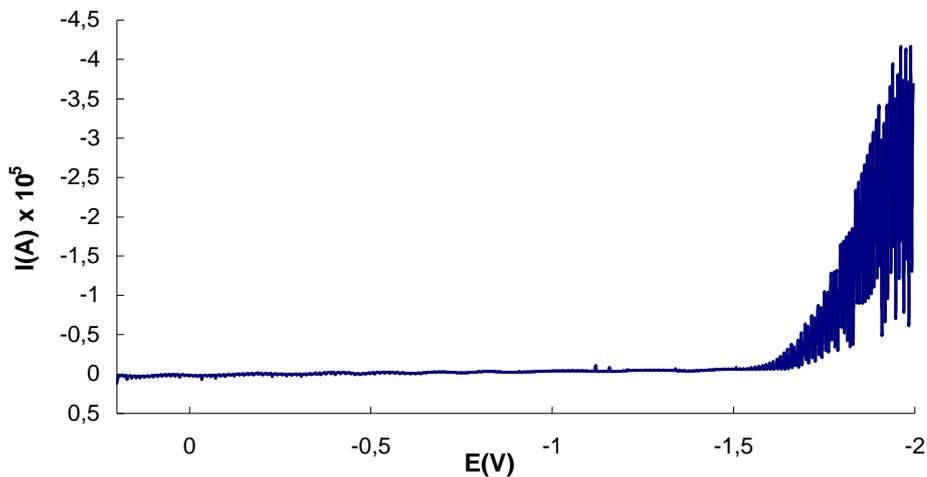
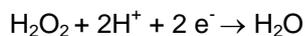
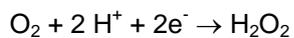
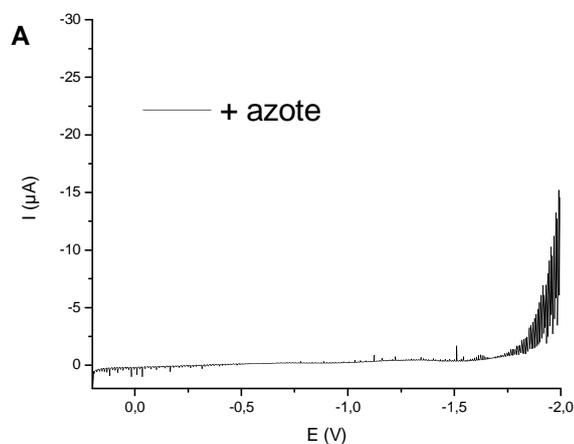


Figure 26 : Polarogramme de la solution d'EPS dans le tampon phosphate après barbotage d'azote

Cette observation permet de vérifier que nous nous trouvons bien sur le cycle :



20 μl d'une solution d' H_2O_2 à 3,5% sont ajoutés aux solutions précédentes. Aucune vague n'est observée pour la réduction d' O_2 mais celle relative à la réduction d' H_2O_2 augmente (figure 27b) avec un potentiel de demi-vague $E_{1/2}(\text{H}_2\text{O}_2) = -0,76\text{V}/\text{ECS}$ dans le tampon phosphate seul. Cette vague est fonction de la quantité d' H_2O_2 ajoutée. Une agitation pendant quelques minutes permet de voir réapparaître la deuxième vague de réduction relative à O_2 (Figure 27c).



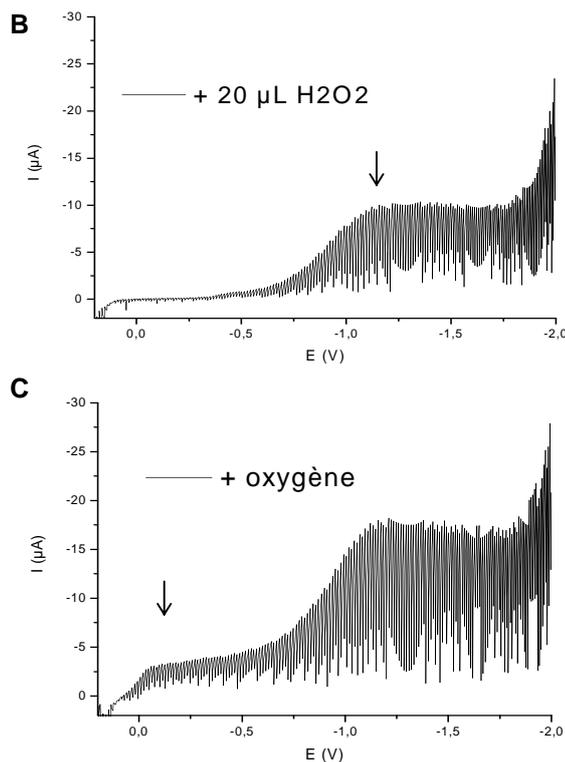


Figure 27 : Polarographies sur mercure d'une solution de tampon phosphate 0,02N à un pH de 7,2 (a) après barbotage d'azote (b) après ajout de 20 µl d'H₂O₂ à 3,5% (c) après ajout d'O₂

b) Polarographies sur électrode tournante de carbone vitreux

Nous avons souhaité pour cette deuxième série d'analyses nous rapprocher des conditions expérimentales en utilisant une électrode en carbone vitreux.

Cette technique s'est avérée moins précise que la polarographie : une seule vague est observée car les deux réductions sont alors confondues. La gamme de courant utilisée est de 1mA et le balayage compris entre 0 à -1V/ECS.

Pour une solution d'EPS seul (2g/L) dans un tampon phosphate (à 0,2N avec pH = 7,2), le palier est observé vers -0,5V/ECS. L'ajout de 20 µl d'H₂O₂ à 3,5% déplace le palier à -0,7V/ECS (figure 28).

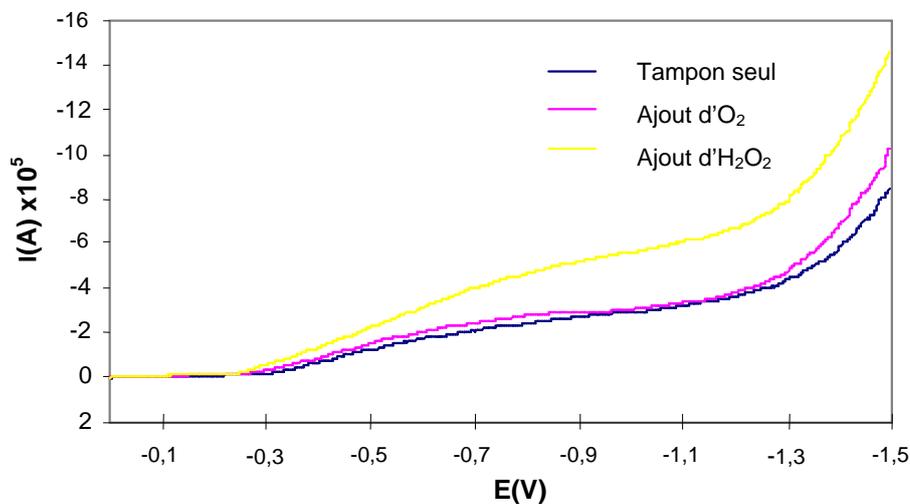
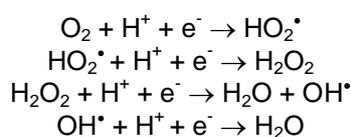


Figure 28 : Polarographie sur carbone vitreux d'une solution de tampon phosphate (0,2N, pH=7,2) seule et après ajout d'H₂O₂.

Le potentiel le plus adapté à l'électrolyse est celui de la demi vague observée. Pour avoir la meilleure efficacité, l'électrolyse a donc été conduite par la suite à un potentiel de -0,7V par rapport à l'ECS.

c) Résultats d'électrolyses

Une première étude a été réalisée dans le tampon phosphate 0,2N avec un pH de 7,2 proposé dans l'étude menée par Harris et al [46]. Le but était de générer des espèces hydroxyles afin de dépolymériser le polysaccharide de la même façon que lors de la catalyse métallique mais sans pollution par un métal. Le mécanisme de dépolymérisation est supposé se dérouler en plusieurs phases : production de radicaux hydroxyles libres, autoxydation et réduction de l'oxygène pour produire de l'eau suivant le cycle [50] :



En l'absence d'ajout d' H_2O_2 , le courant généré est faible (de l'ordre de 30mA). L'ajout d' H_2O_2 a semblé nécessaire pour augmenter la production de courant et catalyser la réaction.

Une première électrolyse a été réalisée dans un tampon phosphate (0,2N, pH=7,2) avec un ajout régulier d' H_2O_2 afin de garder un courant régulier. Le courant se stabilise à 200mA. Cette valeur semble être le palier obtenu entre la formation d' H_2O_2 et sa décomposition. Le ratio massique final $\text{H}_2\text{O}_2/\text{EPS}$ est pour cette expérience très supérieur à 1.

La cinétique de la dépolymérisation de l'EPS a été suivie par des analyses HPSEC. La dépolymérisation semble une nouvelle fois plus efficace dans les premières minutes de la manipulation (Figure 29 courbe a). Par contre, une variation apparente de la masse molaire a été observée avant même le début de l'électrolyse. Une étude en chromatographie sur couche mince inverse a été réalisée en éluant tout d'abord l'EPS avec de l'eau puis avec la solution de tampon phosphate 0,02N. Cette étude a permis de vérifier qu'il s'agissait d'un changement du volume apparent de l'EPS HYD 657 dans le tampon. En effet, les rapports frontaux (tableau 15) mettent en évidence un retard à la migration est observée pour l'EPS en solution dans le tampon phosphate 0,2 N par rapport à l'EPS en solution dans l'eau ou dans un tampon phosphate plus dilué lorsque l'élution se fait à l'eau, de plus, ce retard à l'élution est observé pour l'ensemble des échantillons lorsque l'élution est réalisée dans un tampon phosphate 0,2N.

Ce changement a été également vérifié par des études complémentaires en diffusion de lumière par Zétasizer. Pour se faire, l'EPS natif a été mis en solution à la même concentration dans de l'eau et dans un tampon phosphate 0,2N et les tailles moyennes obtenues comparées. Dans le cas d'une dilution dans le tampon phosphate, la taille moyenne observée est divisée par 2,5, ce qui confirme l'hypothèse qui avait été faite.

Eluant	EPS en solution dans de l'eau	EPS en solution dans un tampon phosphate 0,2N	EPS en solution dans un tampon phosphate 0,2N
Eau	1	1	0,9
Tampon phosphate	0,93	0,93	0,93

Tableau 15 : Etude par CCM inverse (Rfs observés)

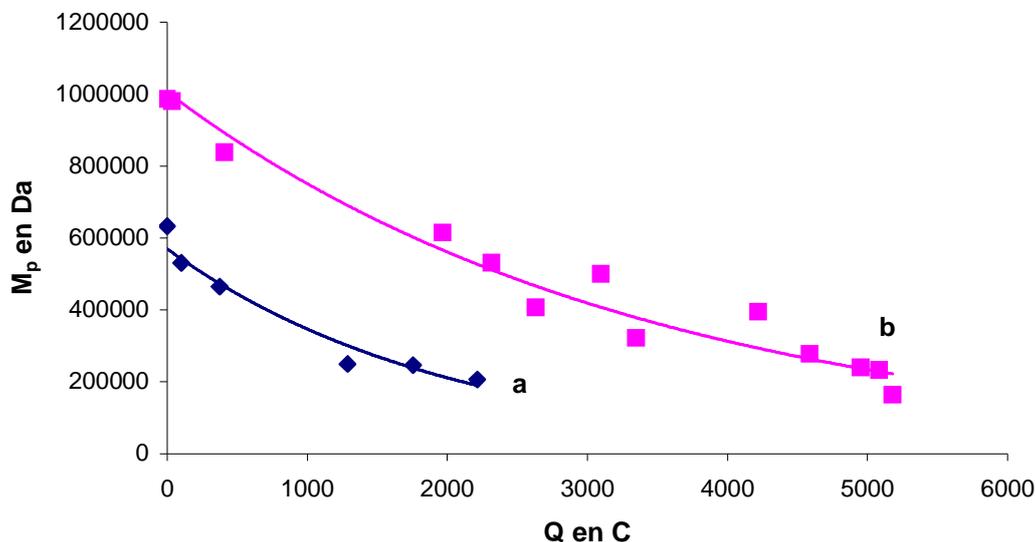


Figure 29 : Evolution de la masse au pic en fonction de la quantité de coulombs pour l'électrolyse de l'EPS en solution dans le tampon phosphate, pH=7,2 **a)** 0,2N **b)** 0,02N

Un tampon moins concentré à 0,02N permettant de simplifier la purification du produit et d'obtenir des masses apparentes plus proches de celles précédemment obtenues a été utilisé par la suite (Figure 29 courbe b). Les échantillons purifiés ont été analysés par IR, les spectres obtenus ne montrent pas de modifications par rapport à ceux de l'EPS natif.

De nouvelles études ont ensuite été réalisées pour des quantités moins importantes d'ajout d'eau oxygénée, des blancs ont été réalisés, cette fois-ci, en parallèle. Les ajouts d' H₂O₂ ont été réalisés de façon fractionnée ou en continue avec un pousse seringue. Le résultat obtenu a été surprenant : la dépolymérisation est observée de la même façon en présence ou non de l'électrolyse. Pourtant nous avons vérifié que l'EPS ne se dégradait ni en contact de la solution tampon, ni en présence d'eau oxygénée. De façon inattendue, l'association d'un excès d'H₂O₂ et du tampon phosphate dégraderait le polymère. Nous nous sommes donc intéressés de plus près à la pureté des produits (Na₂HPO₄, 12 H₂O et KH₂PO₄) utilisés pour la préparation de la solution tampon. Les dosages réalisés révèlent une quantité de métal non négligeable de 0,0005% m/m. Ainsi pour la préparation d'une solution de tampon phosphate pH=7,2 à 0,2N, plus de 6 mg de fer sont introduits. La pollution du tampon phosphate par la présence de métal dans le milieu peut donc expliquer la dépolymérisation lors de l'ajout d'eau oxygénée et ceci même en l'absence d'électrolyse.

6.4- Perspectives

Il ne s'agissait que d'études prospectives mais celles-ci offrent de nombreuses perspectives pour une étude plus poussée.

Cette étude devra s'intéresser plus particulièrement au tampon utilisé. Le tampon phosphate avait été choisi en référence à la publication de Harris et al [46], mais il semblerait que celui-ci ne soit pas adapté. Les concentrations en tampon devront également être optimisées afin de limiter au maximum l'apport de sels nécessitant des étapes de purifications supplémentaires tout en assurant la constance du pH. Il peut être également envisagé de supprimer la solution tampon et d'utiliser une résine afin de tamponner le milieu.

Un apport plus précis d'eau oxygénée doit également être envisagé. L'ajout d' H_2O_2 devra être plus fin que celui réalisé pour ne pas avoir de grands excès d' H_2O_2 dans le milieu source de dégradation. Il pourrait être également envisagé d'utiliser une électrode plus sélective que le carbone vitreux afin de se placer précisément sur la vague de formation de l' H_2O_2 et de ne peut être plus avoir à en ajouter au milieu. Cette nouvelle étude pourrait être réalisée dans un premier temps sur une électrode mercure.

Protocole type utilisé lors de la dépolymérisation par catalyse métallique

200 mg d'exopolysaccharide HYD 657 sont lentement réhydratés pendant une nuit dans 100 ml d'eau Elix à température ambiante. Le lendemain, 2 ml d'une solution de sulfate de cuivre (22 g/L) sont ajoutés sous vive agitation. Le pH de la solution est ajusté à 7,2 par ajout de soude 0,1N. Le mélange est porté à 50°C.

Une solution d'H₂O₂ à 0,66% (m/m) est ajoutée à raison de 0,5 ml.min⁻¹. Le pH est maintenu pendant l'ensemble de la manipulation à 7,2 par ajout de soude 0,1 N.

La réaction est stoppée après 2h, après l'ajout de 60 ml de la solution d'H₂O₂, le ratio massique final H₂O₂/EPS est alors de 0,2.

Environ 100 mg de NaBH₄ sont alors ajoutés, à température ambiante, pour réduire le polysaccharide. L'ajout d'acide acétique permet d'éliminer l'excès de NaBH₄ et de revenir à pH neutre.

Le mélange est filtré (filtres Whatman en microfibrilles de verre), ultrafiltré (membranes Amicon en acétate de cellulose, seuil de coupure de 500 Da) et enfin lyophilisé.

Protocole utilisé lors du premier transfert d'échelle de la dépolymérisation par catalyse métallique

2 g d'exopolysaccharide sont lentement réhydratés dans 1 litre d'eau Elix à température ambiante. La solution est ensuite placée à 50°C sous vive agitation pendant 2h. 20 ml d'une solution de sulfate de cuivre (22 g /L) sont ajoutés au mélange sous vive agitation. Le pH de la solution est ajusté à 7,2 par ajout de soude 1N.

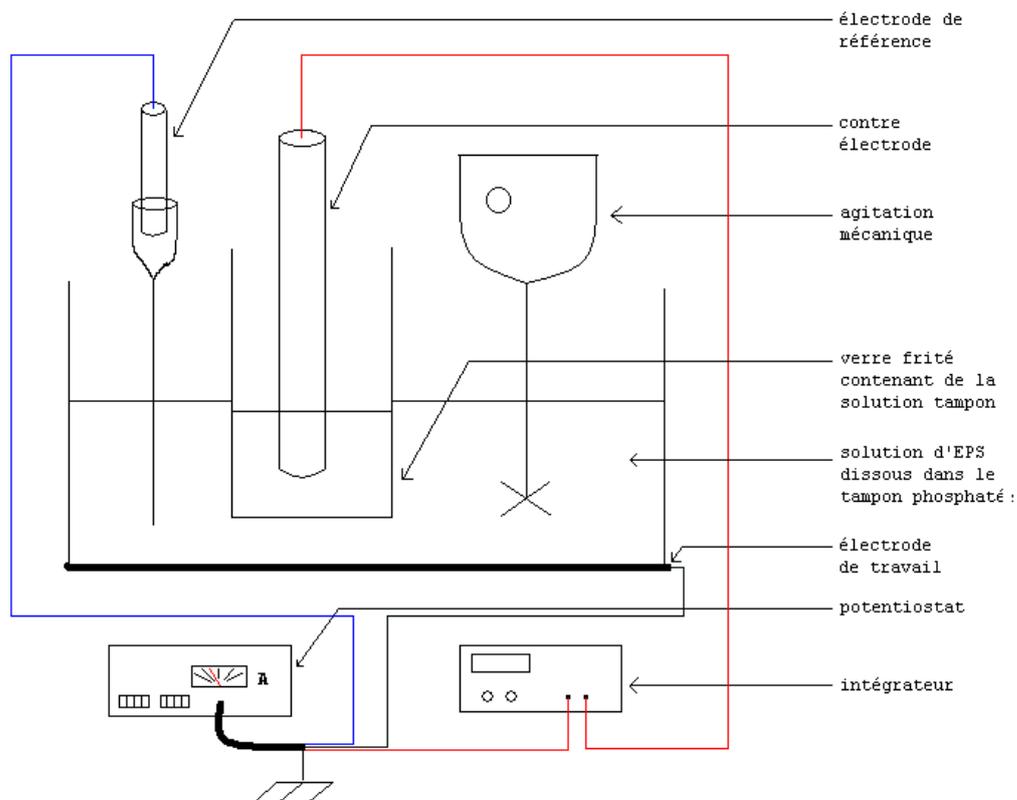
Une solution d'H₂O₂ à 0,3% (m/m) est ajoutée à raison de 2 ml.min⁻¹. Le pH est maintenu pendant l'ensemble de la manipulation à 7,2 par ajout de soude 1 N.

La réaction est stoppée après 2h45, après l'ajout de 335 ml de la solution d'H₂O₂, le ratio massique final H₂O₂/EPS est alors de 0,4.

Environ 1 g de NaBH₄ sont alors ajoutés, à température ambiante, pour réduire le polysaccharide. L'ajout d'acide acétique permet d'éliminer l'excès de NaBH₄ et de revenir à pH neutre.

Le mélange est filtré (filtres Whatman en microfibrilles de verre), puis ultrafiltré et enfin lyophilisé.

Montage électrolytique utilisé



Un verre fritté contenant de la solution tampon permet de séparer le compartiment anodique du compartiment cathodique.

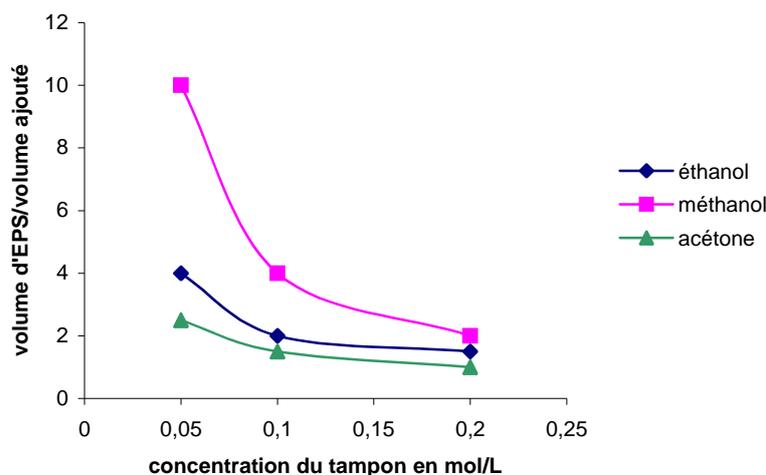
L'ECS doit se trouver proche de l'électrode de travail ($\approx 0,5$ cm) afin d'obtenir un courant convenable.

Afin de suivre la quantité de courant passant dans le système un intégrateur de type IG 5-N est monté en série entre l'électrode de graphite et le potentiostat (EG&G, 362).

Purification de l'EPS en solution dans un tampon phosphate

Différents essais ont été menés pour séparer l'EPS et les sels ajoutés par le tampon sans avoir recours à l'ultrafiltration ou aux dialyses. Ceux-ci sont basés sur la différence de solubilité entre l'EPS et les sels de phosphate dans l'éthanol, le méthanol et l'acétone.

Une première étude a été réalisée pour connaître les volumes nécessaires à une précipitation totale des échantillons en fonction de la concentration du tampon phosphate (pH=7,2) pour une solution à 2g/L d'EPS.



Plus la solution est diluée et plus le volume à ajouter pour obtenir une précipitation totale est important. La dissociation de la précipitation du tampon et des sels est donc simplifiée pour une concentration plus faible du tampon.

Des études ont donc été réalisées sur la dissociation des sels et de l'EPS par différence de solubilité aux deux concentrations de tampon (pH=7,2) utilisées durant cette étude : 0,2 et 0,02N.

Les volumes nécessaires à une précipitation sélective de l'EPS pour les deux concentrations d'EPS sont indiqués dans le tableau ci-dessous:

Solvant	Ethanol	Méthanol	Acétone
EPS 2g/L Tampon 0,2N	1,2 fois le volume en EPS	1 fois le volume en EPS	1,2 fois le volume en EPS
EPS 1,5g/L Tampon 0,02N	Précipitation totale trop rapide pour dissocier	Après 8 volumes pas de précipitation	0,5 fois le volume en EPS

L'acétone est le solvant permettant de récupérer de façon sélective, l'EPS HYD 657 après électrolyse pour un volume minimal et ceci avec un rendement supérieur à 80%.

- 1- Nägeli W. (1874). *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 173, 218-227.
- 2- Guezennec J., Pignet P., Lijour Y., Gentric E., Ratiskol J., Collicec-Jouault S. (1998). Sulfation and depolymerization of a bacterial exo-polysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydrate Polymers*, 37(1), 19-24.
- 3- Karlsson A., Singh S.K. (1999). Acid hydrolysis of sulfated polysaccharides. Desulfation and the effect on molecular mass. *Carbohydrate Polymers*, 38(1), 7-15.
- 4- Belamie E., Domard A., Giraud-Guille M.-M. (1997). Study of the solid-state hydrolysis of chitosan in presence of HCl. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 35(15), 3181-3191.
- 5- Grandmontagne B. (1994). Preparation of chitin and/or chitosan from shells of crustaceans or cephalopods. Brevet FR2701029. 1994-08-05.
- 6- Collicec S., Tapon-Brethaudiere J., Durand P., Fischer A.M., Jozefonvicz J., Kloareg B., Boisson C. (1990). Polysaccharides sulfatés, agent anticoagulant et agent anticomplémentaire obtenus à partir de fucanes d'algues brunes et leur procédé d'obtention. Brevet FR2648463. 1990-06-13.
- 7- Ledderhose G. Z.(1880). *Physiological Chemistry*, 4, 139.
- 8- Ambrecht W. (1919). *Chem Biochemische Zeitschrift*, 95, 108-123.
- 9- Defaye, Jacques (1970). 2,5-Anhydrides of sugars and related compounds. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 25, 181-228.
- 10- Williams J.M. (1975). Deamination of carbohydrate amines and related compounds. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 9-79.
- 11- Williams D.L.H. (1988). *Nitrosation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 12- Allan G.G., Peyron M. (1995). Molecular weight manipulation of chitosan. I. Kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, 277(2), 257-72.
- 13- Wang Y., Hollingsworth R.I., Kasper D.L.(1998). Ozonolysis for selectively depolymerizing polysaccharides containing β -D-aldosidic linkages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6584-6589.
- 14- Wang Y., Hollingsworth R.I., Kasper D.L. (1999). Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 319(1-4), 141-147.
- 15- Simoes R., Castro J. (2001). Ozone depolymerization of polysaccharides in different materials. *Journal of Pulp and Paper Science*, 27(3), 82-87.
- 16- Balakrishnan B, Lesieur S, Labarre D, Jayakrishnan (2005). A Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture: a comparative study. *Carbohydrate research*, 340(7), 1425-1429.
- 17- Scott J.E., Tigwell M.J., Phelps C.F., Nieduszynski I.A. (1976). On the mechanism of scission of alginate chains by periodate. *Carbohydrate Research*, 47(1), 105-117.
- 18- Valles-Pamies B., Barclay F., Hill S.E., Mitchell J.R., Paterson L.A., Blanshard J.M.V. (1997). The effects of low molecular weight additives on the viscosities of cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 34(1/2), 31-38.
- 19- Wellington S.L. (1983). Biopolymer solution viscosity stabilization - polymer degradation and antioxidant use. SPEJ, Society of Petroleum Engineers Journal, 23(6), 901-912.

- 20- Paterson L., Mitchell J.R., Hill S.E., Blanshard J.M.V. (1996). Evidence for sulfite induced oxidative reductive depolymerization of starch polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 292, 143-151.
- 21- Bianchini P. (1984). Oligosaccharide fractions having pharmacological properties by chemical degradation of heparin. Brevet EP121067. 1984-10-10.
- 22- Volpi N., Mascellani G., Bianchini P. (1992). Low molecular weight heparins (5kDa) and oligoheparins (2kDa) produced by gel permeation enrichment or radical process : comparison of structures and physicochemical and biological properties. *Analytical Biochemistry*, 200(1), 100-107.
- 23- Nardella A., Chaubet F., Boisson-Vidal C., Blondin C., Durand P., Jozefonvicz J (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*, 289, 201-208.
- 24- Gallard H., De Laat J., Legube B. (1998). Influence du pH sur la vitesse d'oxydation de composés organiques par Fe(II)/H₂O₂. Mécanismes réactionnels et modélisation. *New Journal of Chemistry*, 1998, 263-268.
- 25- Nardella A., Chaubet F., Siquin C., Collic-Jouault S., Boisson Vidal C., Durand P., Jozefonvicz J. (1997). Manufacture of polysaccharide sulfates with anticoagulant properties. Brevet FR2738009. 1997-02-28.
- 26- Ofman D., Slim G.C., Watt D.K., York S.C (1997). Free radical induced oxidative depolymerisation of chondroitin sulphate and dermatan sulphate, *Carbohydrate Polymer*, 33(1), 47-56.
- 27- Bianchini P., Mascellani G. (1988) Novel oligosaccharides having pharmacological properties by depolymerization of heparin. Brevet US4791195. 1988-12-13.
- 28- Asmus K.D., Möckel H., Henglein A. (1973). Pulse radiolytic study of the site of hydroxyl radical attack on aliphatic alcohols in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry*, 77(10), 1218-1221.
- 29- Schuchmann M.N., von Sonntag C. (1978). The effect of oxygen on the OH-radical-induced scission of the glycosidic linkage of cellobiose. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 34(4), 397-400.
- 30- Von Sonntag C. (1980). Free radical reactions of carbohydrates as studied by radiation techniques. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 37, 7-77.
- 31- Zegota H. (1999). Some quantitative aspects of hydroxyl radical induced reactions in γ -irradiated aqueous solutions of pectins. *Food hydrocolloids*, 16, 353-361.
- 32- Matou S., Collic-Jouault S., Helley D., Siquin C., Ratiskol J., Fisher A.M., Guezennec J. (2004). Utilisation de dérivés de polysaccharide hautement sulfatés et de faible masse molaire pour moduler l'angiogénèse. Brevet FR0406405. 2004-06-14.
- 33- Collic-Jouault S., Chevotot L., Helley D., Ratiskol J., Bros A., Siquin C., Roger O., Fischer A.M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528(2-3), 141-151.
- 34- Collic-Jouault S., Durand P., Fischer A.M., Jozefonvicz J., Letourneur D., Millet J. (2001). Use of a low molecular weight sulfated polysaccharides to obtain a medicine with antithrombotic activity. Brevet WO2001015654. 2001-03-08.
- 35- Liu Z., Perlin A.S. (1994). Evidence of a selective free radical degradation of heparin, mediated by cupric ion. *Carbohydrate Research*, 255, 183-191.

- 36- Chapuis Ph., Favier A. (1995). La cosmétologie. *In Les oligoéléments en nutrition et thérapeutique*. Paris: Editions Médicales Internationales Lavoisier, 355-362.
- 37- Martini M.C., Seiller M. (1999). *Actifs et additifs en cosmétologie*. Paris: Editions Médicales Internationales Lavoisier, 210.
- 38- Loaëc M., Olier R., Guezennec J. (1997). Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research*, 31(5), 1171-1179.
- 39- Hunt S. (1986). Diversity of biopolymer structure and its potential ion-binding applications. Immobilisation of ions by bio-sorption. H. Eccles and S. Hunt. Chichester, E Horwood Ltd Publishers: 15-46.
- 40- Angyal S.J. (1972). Complexes of carbohydrates with metal cation, *Australian Journal of Chemistry*, 25, 1957-1966.
- 41- Angyal S.J. (1973). Complex formation between sugars and metal ions. *Pure Applied Chemistry*, 35, 131-146.
- 42- Angyal S.J. (1989). Complexes of metal cations with carbohydrates in solution. *In Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Tipson R.S. and Horton D. (Eds), Academic Press, 47, 1-43.
- 43- Loaëc M. (1998). Etude de la chélation des métaux lourds –plomb, cadmium et zinc- par quatre exopolysaccharides bactériens d'origine hydrothermale. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale.
- 44- Gould R.O., Rankin A.F. (1970). Calcium complexes of uronic acid monomers. *Journal of the Chemical Society [Section] D: Chemical Communications*, 8, 489-90.
- 45- Anthonsen T., Larsen B., Smidsrod O. (1973). NMR studies of the interaction of metal ions with poly(1,4-hexuronates). II. Binding of europium ions to sodium methyl α -D-galactopyranosiduronate. *Acta Chemica Scandinavica*, 27(7), 2671-2673.
- 46- Harris M.J., Herp A., Pigman W. (1971a). Depolymerization of polysaccharides through the generation of free radicals at a platinum surface: a novel procedure for the controlled production of free-radical oxidations. *Archives of biochemistry and biophysics*, 142(2), 615-522.
- 47- Sudoh M., Kodera T., Sakai K., Zhang J.Q., Koide K. (1986). Oxidative degradation of aqueous phenol effluent with electrogenerated Fenton's reagent. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 19(6), 513-518.
- 48- Brillas E., Casado J. (2002). Aniline degradation by Electro-Fenton and peroxi-coagulation processes using a flow reactor for wastewater treatment. *Chemosphere*, 47(3), 241-248.
- 49- Harris M., Herp A., Phelps R., Pigman W. (1971b). Breakdown of carbohydrates by redox-generated free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 244(3), 501-504.
- 50- Bray R.C. (1970). Free-radical intermediates in the reduction of oxygen. *Biochemical journal*, 117(2), 13-14.

PARTIE 3 : Evaluation de différentes activités biologiques de fractions dépolymérisées

Les deux voies de dépolymérisation envisagées, chimiques et physiques, ont permis l'obtention d'échantillons variés. Afin de déterminer le potentiel applicatif de ces molécules, le passage par des tests d'activités biologiques est indispensable. La réalisation du criblage des activités biologiques a donc été confiée par l'Ifremer à BIOalternatives (laboratoire d'essais *in vitro* spécialisé dans les domaines cosmétique et pharmaceutique implanté près de Poitiers).

L'ensemble des molécules obtenues ne pouvait être testé. Quatre échantillons dépolymérisés par ultrasons basses fréquences et 9 échantillons dépolymérisés par catalyse métallique ont été choisis parmi les molécules obtenues de façon reproductibles.

La recherche d'activités biologiques s'est concentrée sur 3 effets possibles de l'EPS modifié pouvant être appliqués en cosmétique :

- Un effet immunostimulant ;
- Un effet anti-radicalaire ;
- Un effet amincissant.

Cette troisième partie dédiée à la recherche d'activités biologiques compte donc trois sous-parties, chacune traite du principe des essais réalisés et des résultats obtenus pour chaque effet testé.

1- Détermination de l'activité immunostimulante des fractions dépolymérisées

La peau constitue la toute première barrière de l'organisme contre les agressions extérieures. La peau est donc soumise de façon quotidienne aux agressions microbiennes de toute origine : levures, moisissures, champignons microscopiques, bactéries... Le développement de germes pathogènes à la surface cutanée conduit à l'apparition de pathologies de la peau plus ou moins graves qui nécessitent un traitement médical. L'intérêt, en cosmétique, est de chercher à prévenir ce type de problèmes en tentant d'aider, par exemple, la peau à se défendre, mieux et plus vite, contre tout début d'agression microbienne. Dans cette optique, une activité immunostimulante a donc été recherchée sur les fractions dépolymérisées.

1.1- Matériels et méthodes

a) Principe des analyses

L'activité immunostimulante a été évaluée sur 7 fractions dépolymérisées en étudiant l'effet de ces composés sur la multiplication de splénocytes (cellules de la rate participant à la formation des anticorps) de souris. Pour ce faire, un test d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules en phase de croissance exponentielle a été utilisé. L'essai a été réalisé en présence des produits seuls, permettant la recherche d'un effet direct immunostimulant des produits, et en présence de lipopolysaccharide bactérien (LPS) principal activateur de la réponse inflammatoire. Il induit, en effet, la prolifération des splénocytes et active les cellules de la réponse immune innée tels que les

macrophages. La présence de LPS permet donc la recherche d'effet inhibiteur de la prolifération de splénocytes par nos produits.

La radioactivité incorporée a été mesurée en scintillation liquide ce qui a permis la détermination d'un indice de stimulation défini comme :

$$IS = \frac{CPM(\text{produit}) - CPM(\text{contrôle})}{CPM(\text{contrôle})} \text{ où CPM désigne la radioactivité mesurée en nombre de coups}$$

par minute. Les contrôles ont été réalisés dans des puits témoins ne contenant pas le produit à tester.

b) Produits testés

Entrée	Référence de l'échantillon	Conditions d'obtention	M _w (g/mol)
1	CM 52(4)	En présence de cuivre pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	25 500
2	CM 56(6)	En présence de cuivre pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,2	16 200
3	CM 45(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /ZnSO ₄ , pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	11 600
4	CM 57(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /MnSO ₄ , pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,2	10 000
5	US BF	Après 15h d'exposition aux ultrasons (échelle petit pilote)	300 000
6	US 34	Après 4h d'exposition aux ultrasons en présence de cuivre (2,2% m/m)	100 000
7	US 48	Après 10 d'exposition aux ultrasons (échelle laboratoire)	100 000

Tableau 1 : Référence des fractions dépolymérisées testées lors de la recherche d'effet immunostimulant

1.2- Résultats

Comme attendu, le LPS a fortement stimulé la prolifération des splénocytes pour les études témoins réalisées avec des IS compris entre 13 et 18. Les résultats des mesures de la radioactivité pour les différents produits et aux différentes concentrations ont été représentés par des histogrammes en figure 1 (essais sans LPS) et 2 (avec LPS) .

Les activités relevées, les fourchettes de doses actives, la dose efficace et la dose toxique pour l'ensemble des produits testés ont été synthétisées dans le tableau 2.

L'ensemble des échantillons dépolymérisés par catalyse métallique présente un effet immunostimulant sur les splénocytes. Cet effet est dose-dépendant avec une dose efficace pour chacun des produits à la concentration de 0,04% où les IS sont compris entre 2,0 et 5,4.

En présence de LPS, les échantillons dépolymérisés par catalyse métallique testés (entrées 1 à 4, tableau 1) diminuent significativement la stimulation de la prolifération des splénocytes par le LPS : des SI négatifs compris entre -1 et 0 ont été obtenus pour l'ensemble des tests réalisés.

Les trois échantillons dépolymérisés par ultrasons testés (entrées 5 à 7, tableau 1) présentent également un effet immunostimulant sur les splénocytes. Pour les échantillons dépolymérisés seuls (entrées 5 et 7, tableau 1), en l'absence de métaux, cet effet est dose-dépendant avec une dose efficace supérieure (concentration de 0,2%) à celle observée précédemment et des IS compris entre 3,3 et 13 (US BF, entrée 5 du tableau 1). De plus, ces échantillons présentent des doses toxiques plus élevées (pour des concentrations supérieures à 1% contre 0,2% en présence de métal). Par

contre, les échantillons dépolymérisés sous ultrasons en présence de cuivre (entrée 6, tableau 1) semblent se comporter de la même façon que les échantillons dépolymérisés en catalyse métallique avec une dose efficace à la concentration de 0,04% pour un IS de 5,9.

D'autre part, le test de prolifération des splénocytes induite par le LPS a permis de mettre en évidence des propriétés inhibitrices des échantillons dépolymérisés par les ultrasons.

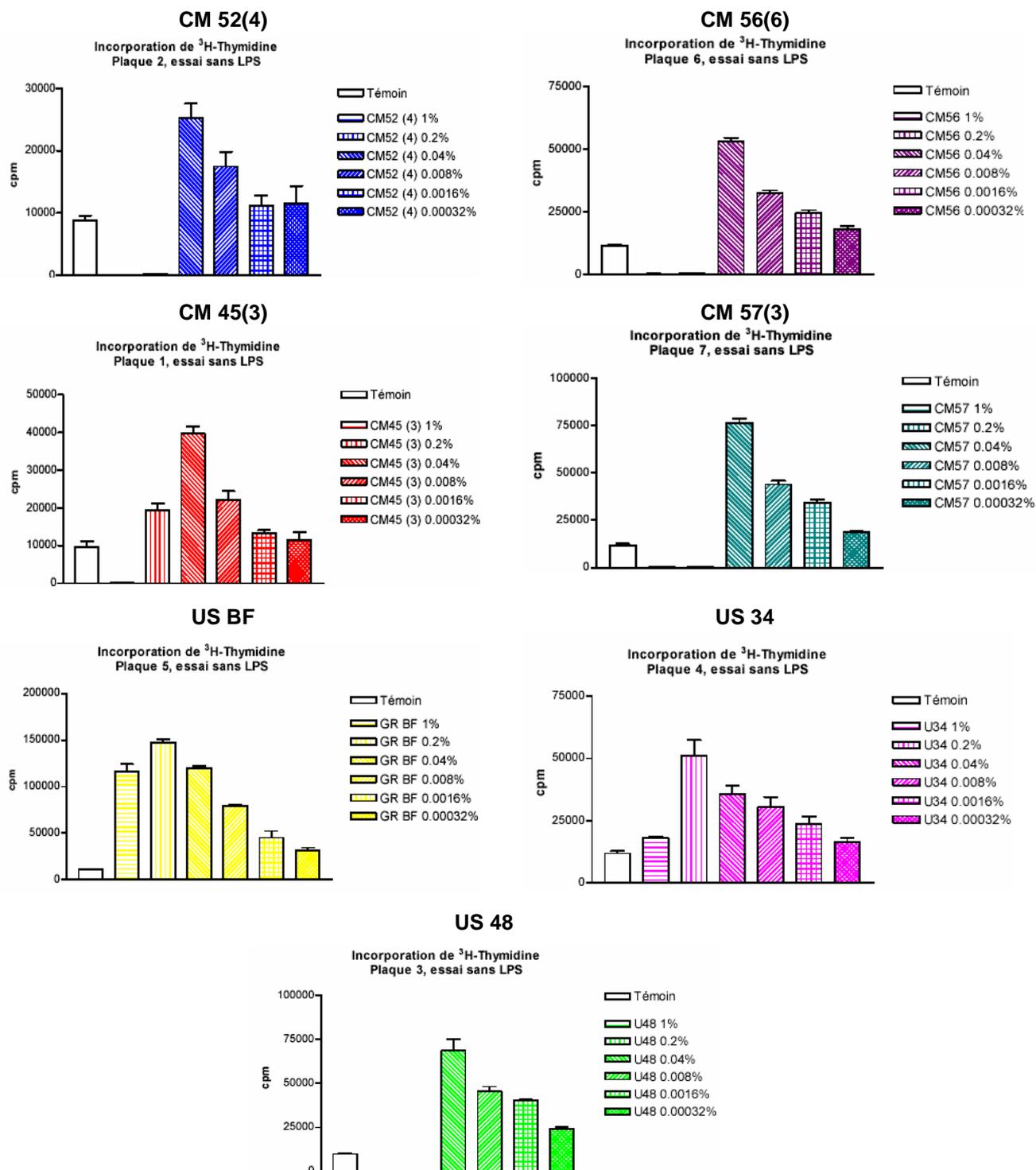


Figure 1: Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules, en l'absence de stimulation par le LPS, en présence de différentes concentrations de fractions d'EPS dépolymérisées

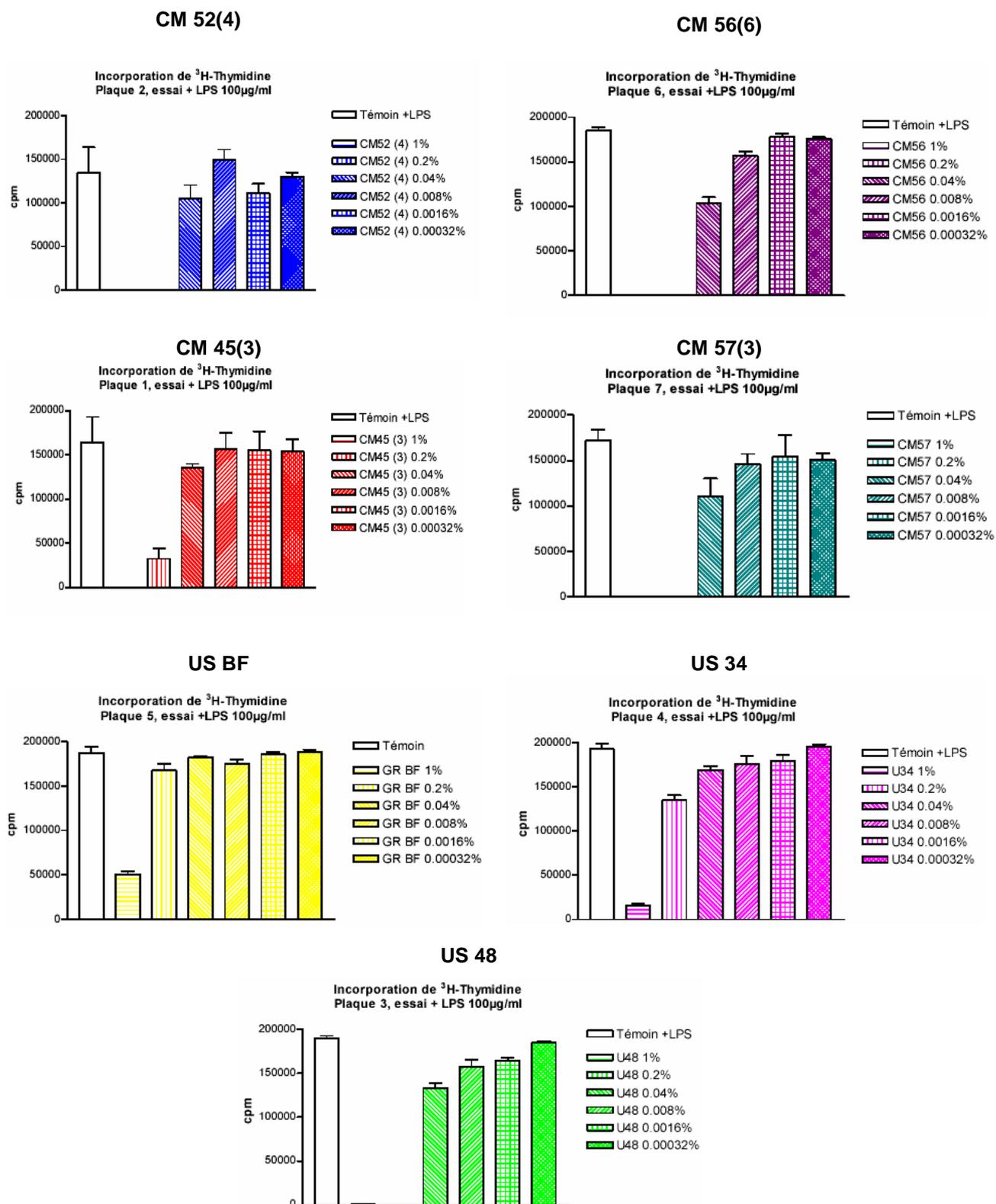


Figure 2 : Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules, en présence d'une stimulation par le LPS et de différentes concentrations de fractions d'EPS dépolymérisées

Référence du produit	Conditions	Fourchettes doses actives (%)	Dose efficace (%)	Dose toxique (%)
CM 52(4)	Seul + LPS	0,04 à 0,00032 0,04	0,04 0,04	0,2 0,2
CM 56(6)	Seul + LPS	0,04 à 0,00032 0,04 à 0,008	0,04 0,04	0,2 0,2
CM 45(3)	Seul + LPS	0,2 à 0,016 0,2 à 0,04	0,04 0,04	1 1
CM 57(3)	Seul + LPS	0,04 à 0,00032 0,04 à 0,008	0,04 0,04	0,2 0,2
US BF	Seul + LPS	1 à 0,0032 1 à 0,2	0,20 1,00	>1 >1
US 34	Seul + LPS	1 à 0,0016 1 à 0,0016	0,20 0,20	>1 >1
US 48	Seul + LPS	0,04 à 0,0032 0,04 à 0,0016	0,04 0,04	1 à 0,2 1 à 0,2

Tableau 2 : Activité de 7 fractions dépolymérisées de l'EPS HYD 657 par catalyse métallique (CM) ou par ultrasons (U et GR) sur la prolifération de splénocytes de souris en culture *in vitro*

1.3- Conclusion

L'ensemble des fractions testées d'EPS HYD 657 dépolymérisé présente des résultats intéressants. En effet, les fractions dépolymérisées, par l'une ou l'autre des 2 voies envisagées, semblent d'une part être immunostimulantes et d'autre part limiter la réponse immunitaire induite par un composé bactérien, le LPS. Les produits dépolymérisés en présence de métaux semblent offrir une activité pour des doses efficaces moins importantes (0,04%) que celles nécessaires pour des produits dépolymérisés seuls (0,2 et 1%). Ces résultats devront être confirmés par de nouveaux tests. Ils devront en particulier déterminer la part du métal résiduel (entre 2 et 6% en masse des produits dépolymérisés par catalyse métallique) dans l'effet immunostimulant observé. Des essais complémentaires pourraient ainsi être envisagés sur les produits les plus efficaces (US BF et CM 57(3)).

2- Détermination de l'effet anti-radicalaire de fractions dépolymérisées

Les radicaux libres se forment de façon continue dans l'organisme sain, en particulier à partir de la chaîne respiratoire et au cours de l'élimination tissulaire de composés peroxydés. Ils favorisent habituellement le bon fonctionnement de l'organisme mais leur excès peut être néfaste. En effet, les stress de toutes natures vont, par exemple, augmenter la formation des radicaux libres et épuiser les réserves de l'organisme en composés protecteurs qui les capturent telles que les vitamines. Ainsi, la protection de la peau des radicaux libres représente un marché important pour les cosmétiques. Cette activité a donc été testée sur 4 échantillons d'EPS HYD 657 dépolymérisés soit par catalyse métallique, soit par les ultrasons.

2.1- Matériels et méthodes

a) Principe de l'essai

Le test biochimique utilisé est basé sur la réaction de Fenton. En effet, dans les cellules, le fer catalyse la formation de radicaux libres selon les équations suivantes :



Dans le protocole utilisé pour cette étude, des micelles de phosphatidylcholine (PC) ont été incubées en présence de fer et de vitamine C dans un tampon Tris (tris(hydroxyméthyl)aminométhane). L'attaque des radicaux hydroxyles sur les micelles produit des substances réagissant avec les acides thiobarbituriques (TBARS). Ceux-ci ont été dosés par mesure de la densité optique (DO) à la fin de l'incubation. En présence de composés anti-radicalaires, la présence des TBARS doit donc être diminuée.

b) Produits testés

Entrée	Référence de l'échantillon	Conditions d'obtention	M _w (g/mol)
1	US 34	Après 4h d'exposition aux ultrasons en présence de cuivre (2,2% m/m)	100 000
2	US 48	Après 10 d'exposition aux ultrasons (échelle laboratoire)	100 000
3	US BF	Après 15h d'exposition aux ultrasons (échelle petit pilote)	300 000
4	CM 52(4)	En présence de cuivre pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	25 500
5	CM 45(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /ZnSO ₄ , pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	11 600

Tableau 3 : Référence des fractions dépolymérisées testées lors de la recherche d'effet anti-radicalaire

2.2- Résultats

Comme attendu :

- le traitement des micelles par la solution d'activation contenant du fer et de la vitamine C (témoin + induction) a conduit à une augmentation significative de la quantité de TBARS formés (induction d'un facteur 4 par rapport au contrôle).
- Le composé anti-radicalaire de référence, Trolox (acide carboxylique 6-hydroxy-2,5,7,8-tétrahyméthylchromane-2 ou vitamine E) à une concentration de 7µM, a significativement diminué la quantité de radicaux libres formés (environ 45% du témoin avec induction et une protection d'environ 70%).

Ces différentes données valident le protocole utilisé.

Les résultats obtenus pour l'EPS HYD 657 dépolymérisé sous ultrasons sont présentés dans le tableau 4.

Le produit US 34 (tableau 3, entrée 1), dépolymérisé sous ultrasons en présence de cuivre, dans la gamme de concentration massique 0,2% à 0,00032% n'a pas permis de réduire significativement la quantité de TBARS formés.

Le produit US 48 (tableau 3, entrée 2) n'a permis de diminuer que légèrement la quantité de radicaux libres formés avec une protection maximum de 21% à une concentration massique de 0,00032% contre 70% pour celle obtenue avec le Trolox.

De même aucun effet significatif n'a été observé pour l'échantillon dépolymérisé par ultrasons à Grenoble (tableau 3, entrée 3).

Traitement	Quantité moyenne de TBARS (DO _{540nm})	Ecart type	% témoin	% de protection	Interférence produit seul DO _{540nm}
Contrôle sans induction	0,053	0,002	26	100	-
Témoin (avec induction)	0,207	0,009	100	0	-
Trolox 7 µM	0,100	0,001	48	70	-
US 34					
0,2%	0,246	0,012	119	-25	0
0,04%	0,206	0,003	99	1	0
0,08%	0,204	0,009	99	2	0
0,016%	0,236	0,008	114	-19	0
0,00032%	0,228	0,009	110	-14	0
US 48					
0,2%	0,425	0,020	205	-142	0,190
0,04%	0,233	0,007	113	-17	0,024
0,08%	0,191	0,025	92	10	0
0,016%	0,183	0,008	88	16	0
0,00032%	0,174	0,009	84	21	0
GR BF					
0,2%	0,170	0,014	82	23	0,017
0,04%	0,192	0,022	93	8	0,005
0,08%	0,186	0,013	90	13	0
0,016%	0,195	0,028	94	7	0
0,00032%	0,163	0,018	79	27	0

Tableau 4 : Effets des produits dépolymérisés sous ultrasons sur la quantité relative de radicaux libérés évaluée par mesure spectrophotométrique de la formation de TBARS (DO_{540nm})

Les résultats obtenus dans le cas des produits dépolymérisés sous catalyse métallique se sont montrés plus significatifs (tableau 5).

Le produit CM 52(4) (tableau 3, entrée 4), dépolymérisé par catalyse métallique en présence de cuivre, a permis de réduire la quantité de TBARS formés avec un effet plus significatif à une concentration massique de 0,0016% (protection de 35%).

Des effets comparables ont été observés pour le produit CM 45(3) (tableau 3, entrée 5), dépolymérisé par catalyse métallique en présence d'un mélange Cu/Zn. La fourchette de doses actives permettant de réduire significativement la quantité de TBARS est comprise entre 0,04 et 0,00032% avec une dose efficace à 0,0016% (protection de 36%).

Traitement	Quantité moyenne de TBARS (DO _{540nm})	Ecart type	% témoin	% de protection	Interférence produit seul DO _{540nm}
Contrôle sans induction	0,054	0,002	24	100	-
Témoin (avec induction)	0,220	0,009	100	0	-
Trolox 7 µM	0,097	0,008	44	74	-
CM 52(4)					
0,2%	0,240	0,006	109	-12	0,031
0,04%	0,201	0,006	92	11	0,008
0,08%	0,182	0,001	83	23	0
0,016%	0,161	0,008	73	35	0
0,00032%	0,181	0,010	82	23	0
CM 45(3)					
0,2%	0,234	0,006	107	-9	0,042
0,04%	0,186	0,005	85	20	0,007
0,08%	0,178	0,005	81	25	0
0,016%	0,161	0,009	73	36	0
0,00032%	0,170	0,012	77	30	0

Tableau 5 : Effets des produits dépolymérisés sous catalyse métallique sur la quantité relative de radicaux libérés évaluée par mesure spectrophotométrique de la formation de TBARS (DO_{540nm})

2.3-Conclusion

Dans cet essai, les composés obtenus par dépolymérisation par catalyse métallique de l'HYD 657 ont montré les meilleurs effets protecteurs contre la formation de TBARS induite par une attaque radicalaire. Les effets obtenus dans le cas des produits dépolymérisés par catalyse métallique ne semblent pas imputables à la seule présence de métaux résiduels. En effet, les échantillons dépolymérisés par les ultrasons en présence de cuivre n'ont pas permis d'obtenir une protection aussi importante.

La concentration la plus active, 0,0016%, n'étant pas cytotoxique, il serait intéressant d'évaluer les effets protecteurs anti-radicalaires des deux produits actifs (CM 52(4) et CM 45(3), entrées 4 et 5 du tableau 3) vis-à-vis de cellules en culture.

3- Détermination de l'effet amincissant de fractions dépolymérisées

Dans ces tests, l'effet inhibiteur de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) est recherché. L'idée est d'objectiver l'effet amincissant des composés polysaccharidiques obtenus. La LPL est importante pour la recherche d'un effet amincissant dans la mesure où elle est impliquée dans la dégradation des lipoprotéines et permet la libération des acides gras véhiculés. Ces acides gras pénètrent dans les adipocytes où, après estérification sur le glycérol, ils sont stockés sous forme de triglycérides. Une diminution de la quantité de LPL peut donc permettre de réduire l'accumulation de graisse dans le tissu adipeux.

L'effet amincissant a été recherché sur 11 fractions dépolymérisées de l'EPS HYD 657 dont 3 dépolymérisés sous ultrasons et 8 par catalyse métallique en présence de métal.

3.1- Matériels et méthodes

a) Principe de l'essai

L'étude a été réalisée dans le but d'évaluer les effets des fractions dépolymérisées sur l'activité LPL héparine-induite dans un modèle de lignée adipocytaire (3T3-L1) suivant les conditions expérimentales décrites par Queferd et al. [1].

La présence d'héparine *in vitro* mime des structures circulantes associées aux lipoprotéines ; elle n'est pas responsable du maintien ou de l'activation de l'enzyme mais d'une plus forte association de la LPL aux chylomicrons [2], grosses lipoprotéines, constituées de lipides alimentaires d'origine intestinale. Des essais plus récents montrent également une importance majeure de l'héparine dans la sécrétion-réinternalisation- dégradation de la LPL [3]. Tout composé interférant avec ces processus aura donc potentiellement un effet amincissant.

Une étude de cytotoxicité préalable menée sur un produit (CM 63(1), entrée 4 du tableau 6) a été réalisée sur des pré-adipocytes 3T3-L1 afin de sélectionner les deux concentrations à tester.

b) Produits testés

Référence de l'échantillon		Conditions d'obtention	M _w (g/mol)
1	US 48	Après 10 d'exposition aux ultrasons (échelle laboratoire)	100 000
2	US BF	Après 15h d'exposition aux ultrasons (échelle petit pilote)	300 000
3	US 34	Après 4h d'exposition aux ultrasons en présence de cuivre (2,2% m/m)	100 000
4	CM 63(1)	En présence de cuivre, pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,1	37 500
5	CM 52(4)	En présence de cuivre pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	25 500
6	CM 56(6)	En présence de cuivre pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,2	16 200
7	CM 44(3)	En présence de cuivre pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	<10 000
8	CM 57(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /MnSO ₄ , pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,2	10 000
9	CM 65(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /ZnSO ₄ , pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,1	44 400
10	CM 46(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /ZnSO ₄ pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	26 700
11	CM 45(3)	En présence d'un mélange CuSO ₄ /ZnSO ₄ , pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	11 600

Tableau 6 : Référence des fractions dépolymérisées testées lors de la recherche d'effet amincissant

3.2- Résultats

a) Cytotoxicité préalable sur pré-adipocytes 3T3-L1

La viabilité des cellules a été évaluée par un test standard au MTT (bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium)[4]. Ce test donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Le principe du test MTT est de mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par clivage du cycle tétrazolium transforme le MTT de couleur jaune en cristaux de formazan bleus. Après dissolution de ces cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée. Les densités optiques obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes. Ainsi une cellule viable sera bleue intense alors qu'elle sera blanche voir transparente en cas de nécrose. L'effet cytotoxique d'un échantillon est évalué par le pourcentage de cellules vivantes en présence de cet échantillon, par rapport aux cellules traitées avec le solvant seul.

Les résultats du test au MTT mené sur l'échantillon CM 63(1), complété d'une observation minutieuse de la morphologie/densité des cellules (tableau 7) ont conduit à sélectionner les concentrations de 0,01 et 0,002 mg/ml pour les essais concernant l'effet amincissant menés sur l'ensemble des produits.

DO à 540 nm pour le CM 63(1)									
mg/ml	0	0,0000128	0,0006	0,0032	0,016	0,08	0,4	2	10
Essai 1	1,361	1,208	1,230	1,055	0,884	0,725	0,438	0,015	0,003
Essai 2	1,267	1,528	1,166	1,139	1,050	0,751	0,628	0,050	0,006
Essai 3	1,233	1,129	1,012	1,170	0,925	0,686	0,543	0,033	0,015
Essai 4	1,214	1,520	1,134	1,155	0,912	0,764	0,601	0,038	0,011
Essai 5	1,263	1,424	1,205	1,177	0,854	0,697	0,597	0,034	0,006
Essai 6	1,339	1,553	1,291	1,312	0,967	0,774	0,606	0,045	0,006
Moyenne	1,235	1,394	1,173	1,168	0,932	0,733	0,569	0,036	0,008
Viabilité (%)	100	113	95	95	75	59	46	3	1
Observations	+	+	+	+	+	+	+/-*	0	0,g

Tableau 7 : Cytotoxicité préalable du produit CM 63(1) vis-à-vis des pré-adipocytes 3T3-L1 en culture (contact 48h). Test au MTT. Observations morphologiques : + population normale, +/- réduction de croissance ou altérations morphologiques, - toxicité, 0 mortalité cellulaire, g grains de produit, * modifications morphologiques

b) Induction de l'activité LPL-Contrôles

L'évaluation de la production-libération de LPL par les adipocytes a été réalisée par dosage de la quantité d'acides gras libérés dans les différents milieux de culture en présence ou en l'absence d'héparine (inducteur de la libération de LPL) (figure 3).

Les milieux de culture « contrôles », les cellules 3T3-L1 non différenciées cultivées en présence d'héparine et les cellules 3T3-L1 différenciées cultivées en l'absence d'héparine, présentent une activité LPL faible par rapport au témoin (cellules différenciées cultivées en présence d'héparine) avec respectivement une activité de 3% et 16% par rapport à ce témoin.

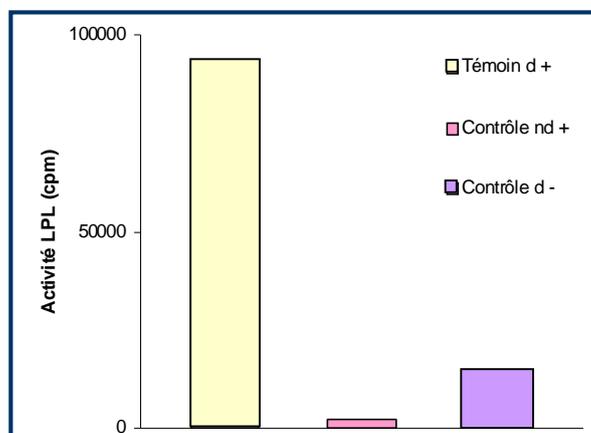


Figure 3 : Contrôles de l'activité LPL évaluée par dosage des acides gras libérés dans les milieux de culture (d : cellules 3T3-L1 différenciées, nd : cellules non différenciées) en présence (+) ou en l'absence (-) d'héparine.

c) Effet des fractions d'EPS dépolymérisées sur l'activité LPL

L'activité des produits dépolymérisés par ultrasons a tout d'abord été testée (figure 4) . Dans les conditions de cet essai, les produits US 48 et US BF (entrées 1 et 2 du tableau 6) à 0,01 mg/ml et 0,002 mg/ml, ont significativement inhibé l'activité de la LPL libérée dans le milieu par les adipocytes en présence d'héparine. Cet effet est dose-dépendant avec respectivement 54% et 38% d'inhibition à 0,01 mg/ml et 31 et 27% d'inhibition à 0,002 mg/ml. Par contre, le produit US 34 (tableau 6, entrée 3) comportant du cuivre n'a pas permis de modifier significativement l'activité LPL induite en présence d'héparine.

PARTIE 3 : Evaluation de différentes activités biologiques de fractions dépolymérisées

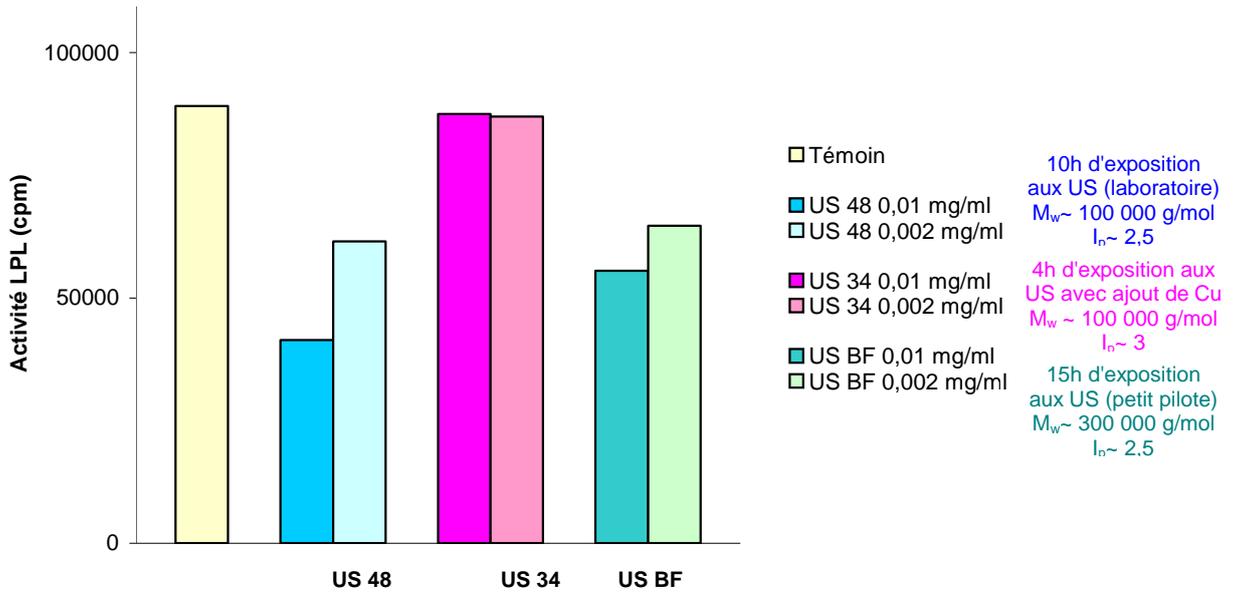
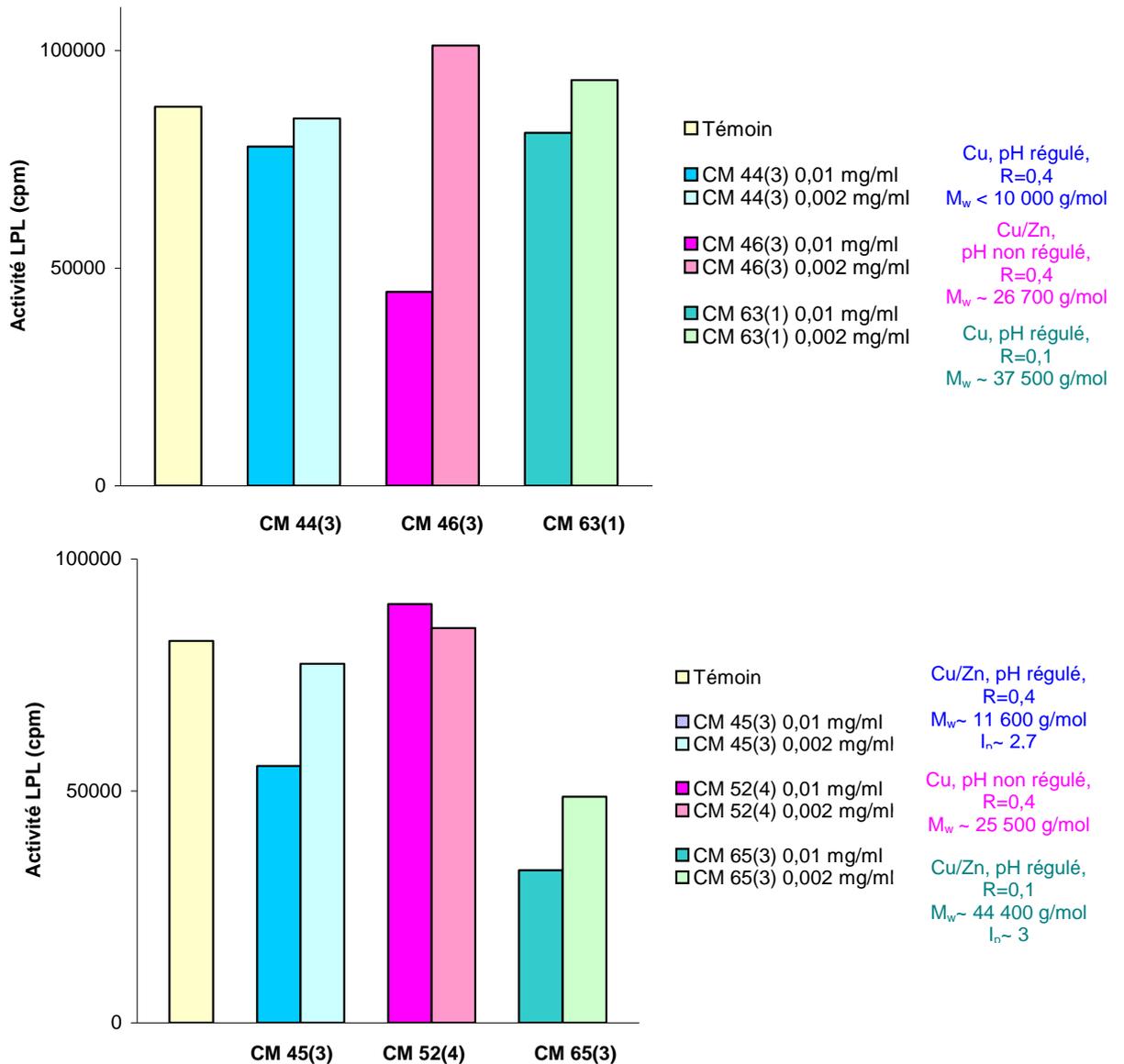
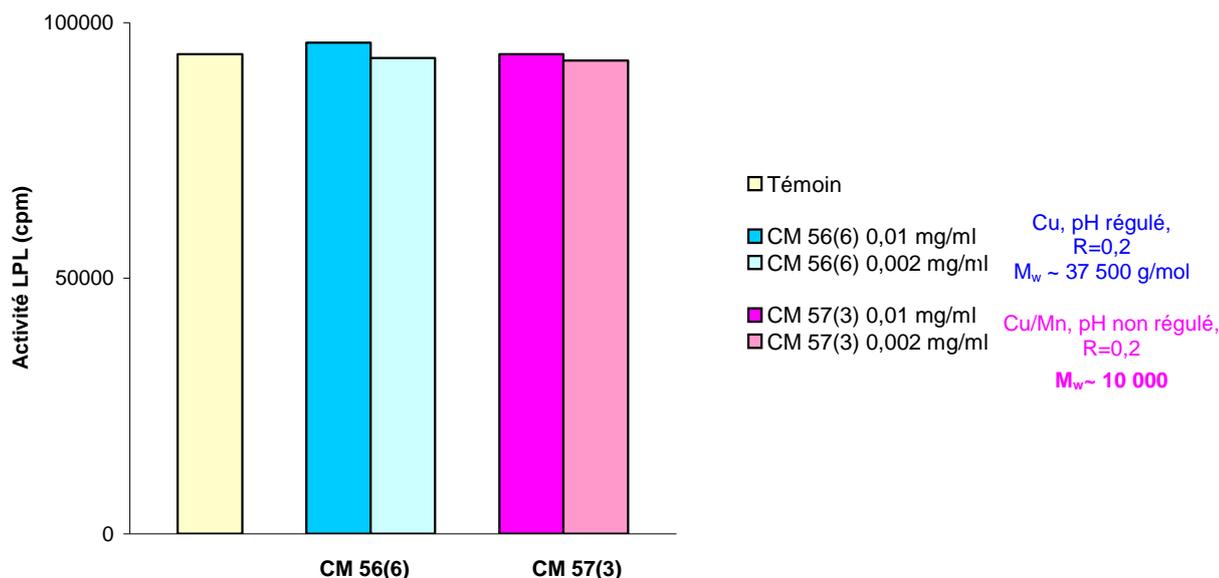


Figure 4 : Effet des fractions dépolymérisées par ultrasons sur l'activité LPL des cellules 3T3-L1, différenciées et mises en présence d'héparine, évalué par dosage des acides gras libérés dans le milieu





Figures 5 : Effet des fractions dépolymérisées par catalyse métallique sur l'activité LPL des cellules 3T3-L1, différenciées et mises en présence d'héparine, évalué par dosage des acides gras libérés dans le milieu

Par la suite, l'activité des produits dépolymérisés par catalyse métallique a été testée (Figures 5). Le produit CM 65(3) (tableau 6, entrée 9) testé à 0,01 mg/ml et 0,002 mg/ml a significativement inhibé l'activité LPL libérée dans le milieu par les adipocytes en présence d'héparine. L'effet observé est dose-dépendant avec une inhibition de 60% à 0,01 mg/ml et 43% à 0,002 mg/ml.

Les produits CM 46(3) et CM 45(3) (tableau 6, entrées 10 et 11) testés à 0,01 mg/ml en présence d'héparine ont permis d'inhiber significativement l'activité LPL libérée par les adipocytes (respectivement 33% et 48% d'inhibition par rapport au témoin réalisé en présence d'héparine). Par contre, à 0,002 mg/ml, ce produit n'a pas modifié l'activité LPL induite par l'héparine.

Les produits CM 63(1), CM 52(4), CM 56(6), CM 44(3), et CM 57(3) (tableau 6, entrées 4-8) n'ont quant à eux pas permis de modifier significativement l'activité LPL induite en présence d'héparine dans les conditions testées.

Si nous nous intéressons de plus près aux fractions actives dépolymérisées par catalyse métallique, seules les fractions dépolymérisées en présence du mélange Cu/Zn pourraient présenter un effet amincissant. L'effet du mélange de métal ne peut pas expliquer à lui seul l'inhibition de l'activité des LPL puisque cette activité a également été observée pour des échantillons dépolymérisés par les ultrasons seuls.

3.3- Conclusion

Les résultats de ces essais *in vitro* permettent de classer les produits en trois groupes :

- les produits avec effet dose : CM 65(3) dépolymérisés par catalyse métallique en présence d'un mélange Cu-Zn ainsi que les fractions US 48 et US BF dépolymérisés par les ultrasons seuls ;
- Les produits inhibiteurs à 1 concentration : CM 46(3), CM 45(3) ont été dépolymérisés par catalyse métallique en présence d'un mélange Cu-Zn ;
- Les produits sans effet CM 63(1), CM 44(3), CM 52(4), CM 56(6), CM 57(3) et US 34 sont les produits dépolymérisés en présence de Cu seul ou d'un mélange Cu/Mn.

Seules les fractions obtenues par dépolymérisations par catalyse métallique en présence de zinc se sont révélées actives. Ces résultats semblent vérifier une activité inhibitrice du zinc sur les lipoprotéines lipases [5]. Une activité a également été observée pour des fractions de masses molaires plus importantes obtenues par dépolymérisation sous ultrasons en l'absence d'ajout.

Seule une faible fraction de produit déposé est susceptible d'atteindre *in vivo* les adipocytes dans l'hypoderme, aussi, le fait que les produits soient actifs à de faibles concentrations permet d'espérer une activité *in vivo*

4- Conclusions

Il faut rappeler que ces premières études d'activités biologiques ont été réalisées dans un laboratoire extérieur au projet. Il s'agit de premiers screenings rapides d'activités biologiques dans le domaine visé des cosmétiques et ces premiers résultats ne sont arrivés qu'en fin de thèse. Il ne s'agit donc que de pistes qui scientifiquement nécessiteront des approfondissements et la réalisation de nouveaux tests. Ainsi, l'EPS natif devra faire l'objet d'études en tant que témoin. De plus, de nouvelles études devront permettre de déterminer le rôle joué par les métaux dans les activités observées. Les implications structurales dans les effets observés entre les échantillons dépolymérisés par les ultrasons pour lesquels la structure est conservée et ceux dépolymérisés par catalyse métallique pour lesquels elle semble modifiée devront également être étudiées.

Ces premiers criblages d'activités biologiques de fractions dépolymérisées, selon les deux voies utilisées et dans différentes conditions, se sont cependant révélés encourageants. En effet, ils ont d'ores et déjà permis de mettre en évidence des applications potentielles des fractions obtenues dans le domaine visé des cosmétiques (tableau 8).

Ainsi, l'ensemble des fractions testées d'EPS HYD 657 dépolymérisé présente des résultats intéressants en immunostimulation. En effet, les produits semblent, d'une part, présenter un effet immunostimulant direct et, d'autre part, limiter la réponse immunitaire induite par un composé bactérien, le LPS.

De plus, les composés obtenus par dépolymérisation par catalyse métallique de l'HYD 657 ont montré pour les deux fractions testées des effets protecteurs contre la formation de TBARS induites par une attaque radicalaire. Un effet anti-radicalaire peut donc être envisagé pour ces fractions.

Enfin, certaines fractions dépolymérisées par chacune des voies ont permis de diminuer la quantité de LPL ce qui peut permettre de réduire l'accumulation de graisse dans le tissu adipeux et produire un effet amincissant.

Le fait que les différents produits testés soient actifs à de faibles concentrations permet d'espérer une activité *in vivo*. De nouvelles études plus poussées sur les fractions les plus actives seront nécessaires afin de conforter ces premiers résultats obtenus *in vitro*.

Référence de l'échantillon	Conditions d'obtention	M _w (kg/mol)	Effet immunostimulant	Effet antiradicalaire	Effet amincissant
----------------------------	------------------------	-------------------------	-----------------------	-----------------------	-------------------

PARTIE 3 : Evaluation de différentes activités biologiques de fractions dépolymérisées

US 48	10 d'exposition aux ultrasons (échelle laboratoire)	100	+	-	+
US BF	15h d'exposition aux ultrasons (échelle petit pilote)	300	+	-	+
US 34	4h d'exposition aux ultrasons en présence de cuivre (2,2% m/m)	100	+	-	-
CM 63(1)	En présence de cuivre, pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,1	37,5	nd	nd	-
CM 52(4)	En présence de cuivre pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	25,5	+	+	-
CM 56(6)	En présence de cuivre pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,2	16,2	+	nd	-
CM 44(3)	En présence de cuivre pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	<10	nd	nd	-
CM 57(3)	CM avec CuSO ₄ /MnSO ₄ , pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,2	10	+	nd	-
CM 65(3)	CM avec CuSO ₄ /ZnSO ₄ , pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,1	44,4	nd	nd	+
CM 46(3)	CM avec CuSO ₄ /ZnSO ₄ pH non régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	26,7	+	nd	+
CM 45(3)	CM avec CuSO ₄ /ZnSO ₄ , pH régulé, R(H ₂ O ₂ /EPS)=0,4	11,6	nd	+	+

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différents effets observés pour chaque produit testé (nd : non déterminé, + : effet mis en évidence, - : pas d'effet)

Evaluation de l'effet des composés sur la prolifération des splénocytes de souris

Test standard d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules

Les produits ont été dilués dans du milieu PBMC constitué de cellules mononuclées du sang périphérique mises dans un milieu de culture complet (« RPMI 1640 » supplémenté par 2 mM de glutamine, 100 µg/ml de pénicilline, 100 U/ml de streptomycine, $5 \cdot 10^{-6}$ M de β mercaptoéthanol et 10% de sérum de veau fœtal (SVF)). A partir d'une solution mère préparée à 4% (m/v) en milieu PBMC, différentes dilutions ont été utilisées : 1%, 0,2%, 0,04%, 0,008% et 0,0016%.

Les produits aux différentes concentrations ont été testés sur des plaques de 96 puits stériles. Sur une même plaque, un seul produit a été testé en présence ou en l'absence de LPS. Les tests ont été réalisés en triple.

Après dépôt des solutions de produits seuls ou de produits avec ajout de LPS (100µg/ml), les splénocytes (issus de rates de souris de lignée BALB/c) ont été distribuées à raison de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/puits (100µl) et cultivées à 37°C, en atmosphère à 5% de CO₂. Le volume final des dépôts est de 200 µl. Des puits témoins, ne contenant pas de produit, ont été réalisés.

Après 30 heures d'incubation, soit 18 heures avant la fin des cultures, l'ADN des cellules en division a été marqué par addition de 1 µCi/puits de [méthyl-³H]-thymidine (3,15 TBq/mmoles, 85 Ci/mmol).

La récolte a été réalisée par aspiration avec un collecteur Skatron et transfert sur filtre Skatron. Les puits ont été lavés avec 6 fois 1 ml d'eau puis 2 fois 1 ml d'éthanol à 70%. Les filtres secs ont été découpés, et la radioactivité incorporée a été comptée en scintillation liquide avec un compteur LKB 1211 Rackbeta.

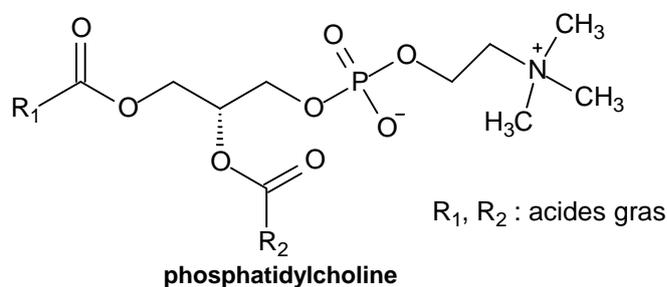
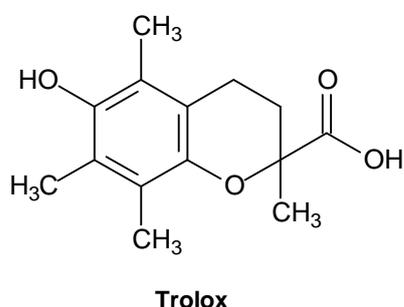
Les données brutes ont été transformées sous le logiciel PRISM® (Graph Pad Software) pour un traitement statistique. Le calcul des indices de stimulation (IS) est réalisé sous Excel.

Evaluation de l'effet anti-radicalaire des composés dépolymérisés

Analyse biochimique de la production de « TBARS »

A partir d'une solution mère préparée à 2% (m/v) en tampon Tris (20 mM, pH=8), différentes dilutions ont été utilisées : 1%, 0,2%, 0,04%, 0,008% et 0,0016%.

Les micelles de PC ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C, en présence d'une solution d'activation (mélange de FeSO₄ et de vitamine C en tampon Tris) et de l'EPS dépolymérisé ou du Trolox (acide carboxylique 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrahydro-2H-chromen-2-one, il s'agit de la vitamine E), composé anti-radicalaire de référence, à une concentration finale de 7µM. Chaque condition expérimentale est réalisée en triple.



La réaction est stoppée par addition d'indole et les TBARS formés ont été quantifiés par mesure de la densité optique à 540 nm. Des contrôles d'absence d'interférences des produits ont été réalisés en incubant les produits en présence de la solution d'activation mais sans micelles, les interférences potentielles pour le produit seul ont été quantifiées.

Les données brutes ont été transformées sous le logiciel PRISM® (Graph Pad Software) pour un traitement statistique puis sous tableur Microsoft Excel.

Effets des composés dépolymérisés sur l'activité de la LPL produite par des adipocytes 3T3-L1

- **Conditions de culture et de différenciation des 3T3-L1**

Les cellules utilisées sont des pré-adipocytes de souris de lignée qui ont été cultivées à confluence en milieu de croissance, avec un changement de milieu au bout de 2 jours (plaque de 24 puits). Le milieu de croissance est constitué de DMEM (milieu Eagle modifié par Dubelco) en présence de L-glutamine 2 mM, de péniciline 50 UI/ml, de streptomycine 50 µg/ml, d'amphotéricine B 0,25 µg/mL et de SVF à 10% v/v.

A forte confluence, les cellules sont transférées en milieu de différenciation et incubées pendant 48h. Le milieu de différenciation est préparé en ajoutant au milieu de croissance : 0,5 mM de méthylisobutyl xanthine, 1µg/ml d'insuline et 0,25 µM de dexaméthazone.

Après différenciation, les cellules ont été transférées en milieu de post-différenciation. Il s'agit du milieu de croissance auquel de l'insuline a été ajoutée (1µg/ml final) puis incubées pendant 48 h. Des cultures contrôles ont été réalisées en milieu de croissance 3T3-L1 pendant toute la durée de l'expérience.

- **Cytotoxicité préalable**

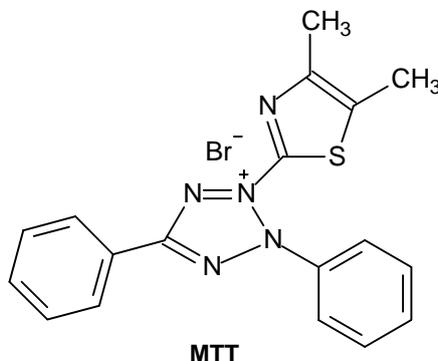
L'étude de cytotoxicité a été réalisée sur des pré-adipocytes de souris 3T3-L1 confluent après contact avec le produit CM 63(1) pendant 48h en milieu DMEM à 10% de SVF. La viabilité a été évaluée par un test standard au MTT (Bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) [4]. Ce test donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Le principe du test MTT consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium transforme le MTT de couleur jaune en cristaux de formazan bleus. Après dissolution de ces cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée. Les densités optiques obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes. Ainsi une cellule viable sera bleu intense alors qu'elle sera blanche voir transparente en cas de nécrose. L'effet cytotoxique d'un échantillon est évalué par le pourcentage de cellules vivantes en présence de cet échantillon, par rapport aux cellules traitées avec le solvant seul.

Le test au MTT a été complété d'une observation minutieuse de la morphologie/densité des cellules.

Conditions utilisées

- Plaques : 96 puits
- Pré-culture : 24h
- Cellules/puits : 10 000 pré-adipocytes de souris 3T3-L1

- Gamme de produit : solution de mère à 10 mg/ml puis préparation de solutions à 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032, 0,0006, 0,00128 mg/ml.
- Réplicates : 6
- Contact cellules/produit : 48h
- Paramètre d'évaluation : hydrolyse MTT



- **Dosage de l'activité LPL**

La LPL est une enzyme qui agit sur les lipoprotéines en libérant des acides gras. Les adipocytes obtenus selon le protocole décrit précédemment ont été incubés pendant 72h en milieu de croissance (DMEM à 10% de SVF). A confluence, le milieu a été éliminé puis remplacé par du milieu neuf contenant ou non les produits à l'essai puis les adipocytes ont été incubés à 37°C pendant 24 h. Pendant les 45 dernières minutes de l'incubation, une addition d'héparine de 10 U/ml est réalisée ou pas (contrôle), la présence d'héparine permet d'induire la libération de LPL.

La quantification de l'activité LPL dans les milieux de culture a été réalisée par dosage des acides gras libérés selon le test radiobiochimique décrit par Querfeld et al [1]. Le substrat utilisé correspond à une émulsion stable de ³H-trioléine-lécithine préparée en glycérol (22 Ci/mmmole).

100 µl de surnageant de culture ont été incubés en présence de 100 µl de substrat dilué en tampon Tris/BSA 2%. Après 1h30 d'incubation à 37°C, la réaction a été stoppée en ajoutant une solution d'extraction des acides gras libérés. Après extraction puis centrifugation 10 minutes à 3000 rpm, une fraction de surnageant a été prélevée (fraction acide gras) et la radioactivité a été comptée en scintillation liquide.

La viabilité cellulaire a été évaluée sur les tapis cellulaires à l'aide d'un teste au MTT.

Un contrôle de l'absence d'interférence du produit sur la réaction de dosage a été réalisé, ce qui permet de vérifier la spécificité des effets potentiels observés.

- 1- Querfeld U., Hoffmann M., Klaus G., Eifinger F., Ackerschott M., Michalk D., Kern P.A. (1999). Antagonistic effects of vitamin D and parathyroid hormone on lipoprotein lipase in cultured adipocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(10), 2158-2164.
- 2- Patten R.L., Hollenberg C.H. (1969). The mechanism of heparin stimulation of rat adipocyte lipoprotein lipase. *Journal of Lipid research*, 10(4), 374-382.
- 3- Cisar L.A., Hoogewerf A.J., Cupp M., Rapport C.A., Bensadoun A. (1989). Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(3), 1767-1774.
- 4- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- 5- Pfaff, K.; Kujawa, M. (1981). Effect of metals on the activity of lipoprotein lipase. *Mengen-Spurenelem., Arbeitstag*, 295-299.

PARTIE 4 : Modulations structurales de l'HYD 657 natif ou partiellement dépolymérisé

Très peu d'études ont été menées sur des polysaccharides possédant une structure aussi complexe que ce soit à l'état natif ou partiellement dépolymérisé. Une étude de faisabilité en vue d'extensions de ce travail de thèse a donc été recherchée. Ainsi, les modulations structurales ont été ciblées parmi les fonctionnalisations les plus communément décrites dans la littérature : l'ajout de groupements chargés négativement ou positivement, l'ajout de chaînes grasses ou encore des modifications structurales fortes par oxydation. Du fait de la complexité du polymère HYD 657, l'analyse des modifications réalisées, notamment la mise en évidence des sélectivités rencontrées, sont difficiles. Des méthodes de caractérisations qualitatives et quantitatives ont été recherchées afin de mettre en évidence les modifications induites. Il est important de noter enfin que chaque modulation pourra faire l'objet d'un travail spécifique de développement. Dans ces travaux préliminaires et dans la perspective d'une possible industrialisation, les conditions expérimentales choisies autorisent systématiquement une extension d'échelle. En fin, la reproductibilité des manipulations est également apparue comme un facteur important.

1- Modifications chimiques des polysaccharides

Les polysaccharides offrent un ensemble impressionnant de structures primaires et de conformations. Leurs omniprésences et leurs divers rôles dans les systèmes biologiques témoignent du large spectre de leurs fonctionnalités. Il est connu depuis longtemps que les caractéristiques et les utilisations des polysaccharides natifs peuvent être considérablement élargies par des modifications de sa structure primaire et la présence de charge anionique ou cationique. Ces transformations vont influencer directement sur la conformation du polymère, son hydrophobie, sa solubilité, voire sa stabilité. Toutes ces modifications auront donc un impact conséquent sur les propriétés biologiques, chimiques et physiques.

De nombreuses connaissances sont disponibles concernant la modification de polysaccharides [1,2]. Les techniques de modification des polysaccharides peuvent être classées en deux catégories selon qu'elles soient sélectives ou non. Les méthodes non sélectives introduisent les substituants de façon plus ou au moins aléatoire. Les méthodes sélectives exploitent les différences de réactivités chimiques des groupements fonctionnels disponibles tels que les fonctions carboxyles, hydroxyles ou amines. En absence de tels sites, la sélectivité de la réaction dépend d'activations sélectives ou de l'introduction des fonctions réactives appropriées par des méthodes chimiques ou enzymatiques. Parmi les avantages des réactions sélectives, l'utilisation de réactifs et de conditions de réactions douces permettent d'éliminer ou de minimiser la formation de produits secondaires et/ou la dégradation partielle ou la dépolymérisation du polymère natif qui sont associées de façon quasi-systématiques aux méthodes de fonctionnalisation non sélectives. Des réactions classiques telles que l'introduction de groupements alkyles, hydroalkyles, halogènes, nitrates, phosphates, sulfates, sulfonates... ne sont généralement pas sélectives mais un certain degré de sélectivité peut être

obtenu sous des conditions de réactions bien choisies. Autre avantage des fonctionnalisations sélectives, celles-ci facilitent la caractérisation des produits. Elles peuvent également jouer un rôle essentiel dans l'établissement de connaissances fondamentales sur les relations structures-propriétés, limitées dans le cas spécifique des polysaccharides du fait, entre autre, de leur complexité intrinsèque (hétérogénéité en termes de structures, de distribution de masses molaires...). Un autre facteur important qui distingue les polysaccharides des autres types de polymères est leur réactivité chimique unique. En effet, même pour les polysaccharides les plus simples, il existe intrinsèquement plusieurs sites de fonctionnalisations potentiels par monomère, ceci implique donc des réactivités différenciées, complexes à contrôler. Le contrôle régiosélectif des réactions peut donc impliquer des prétraitements préalables ou l'élaboration de stratégies de synthèses.

Ceci explique pourquoi la plupart des protocoles de modifications chimiques ont été développés sur des polysaccharides bien définis et relativement simples structuralement comme la cellulose constituée exclusivement d'unités β -D-glucose reliées entre elles par des liaisons de type $\beta(1\rightarrow4)$ [3], l'amidon qui est également un polymère de glucose [4] ou encore d'autres homopolymères tels que le pullulane [5]. Des modifications non sélectives ont été réalisées sur ces polymères. Ces dernières années, de nombreuses méthodes de modifications plus sélectives et homogènes ont été mises au point en réponse à la demande croissante de polysaccharides modulés par des substitutions contrôlées et uniformes. Quand les produits obtenus ne sont pas totalement substitués, une répartition non uniforme des motifs greffés est généralement observée. En effet, les régions cristallines ou non cristallines des polysaccharides sont modifiées, dans une certaine mesure, par rapport à l'avancée de la réaction. La substitution d'un motif à l'intérieur d'une unité polymérique peut affecter les propriétés molaires dans les mêmes mesures qu'une substitution globalement uniforme. Ce degré de substitution (DS) se définit comme le nombre moyen de sites substitués par motif d'une unité de répétition. Ainsi, notre exopolysaccharide possède une unité de répétition comportant 11 motifs sucres et 27 hydroxyles libres, son DS maximum théorique est donc de 2,45.

2- Ajout de groupements chargés négativement sur l'EPS

Deux types de groupements chargés négativement ont été ajoutés à l'EPS : des sulfates et des phosphates. L'ajout de ce type de groupements sur d'autres polysaccharides tels que les dextrans ou les pullulanes a déjà permis la mise au point de dérivés avec des activités biologiques et des applications médicales intéressantes en tant que, par exemple, anticoagulants, antiviraux ou anti-inflammatoires.

2.1- Sulfatation

Il est connu que l'introduction de groupements additionnels de sulfates à un polysaccharide peut lui conférer de nouvelles caractéristiques pouvant élargir son champ d'application. Ainsi, il est maintenant établi que les groupements sulfates jouent un rôle prédominant dans l'activité antithrombotique de l'héparine. La préparation de produits bioactifs à partir de molécules d'origine bactérienne et non animale évite le risque de contamination par des agents pathogènes, parfois présents dans les tissus de mammifères par exemple (virus, prion). Des études ont, notamment, été

réalisées concernant la sulfatation de précurseurs de glycosaminoglycan(n)es produits par les souches *Escherichia coli* K4 et K5 [6,7]. Des applications de polysaccharides bactériens sulfatés ont également été décrites dans la cosmétique. Ils sont, par exemple, déjà utilisés dans des traitements pour la prévention de la chute des cheveux [7].

a) La réaction de sulfatation

La sulfatation de l'EPS a été réalisée directement sur l'EPS natif ou partiellement dépolymérisé par catalyse métallique ou sous ultrasons.

Parmi les réactifs de sulfatation mentionnés dans la littérature, on peut citer : l'acide sulfurique concentré, les complexes SO₃ avec la pyridine, le DMF, le SO₂ liquide, le DMSO ou encore HClSO₃ dans le formamide ou la pyridine.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux complexes les plus généralement utilisés, ceux formés par SO₃ avec la pyridine et le DMF.

La stabilité du complexe formé dépend de la basicité du donneur utilisé et influence la réactivité de la réaction de sulfatation. Il a donc paru intéressant de comparer différents complexes : pyridine-sulfate (Pyr-SO₃) sous sa forme commerciale ou celui synthétisé au laboratoire avec de la pyridine et HClSO₃ (figure 1) et le complexe N,N diméthylformamide-sulfate (DMF-SO₃).

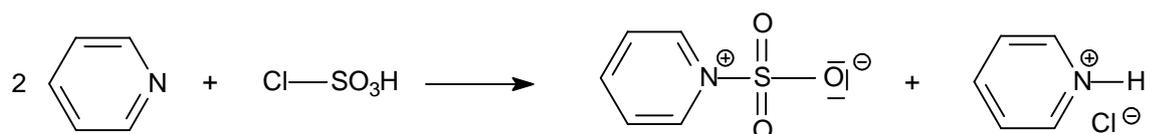


Figure 1 : Formation du complexe Pyr-SO₃ à partir de l'acide chlorosulfonique

La réaction entre le complexe SO₃ et le polysaccharide commence très probablement par la formation d'une liaison hydrogène avec les hydroxyles du polysaccharide ce qui augmente l'électrophilie du soufre et la nucléophilie des groupements hydroxyles (figures 2) [8].

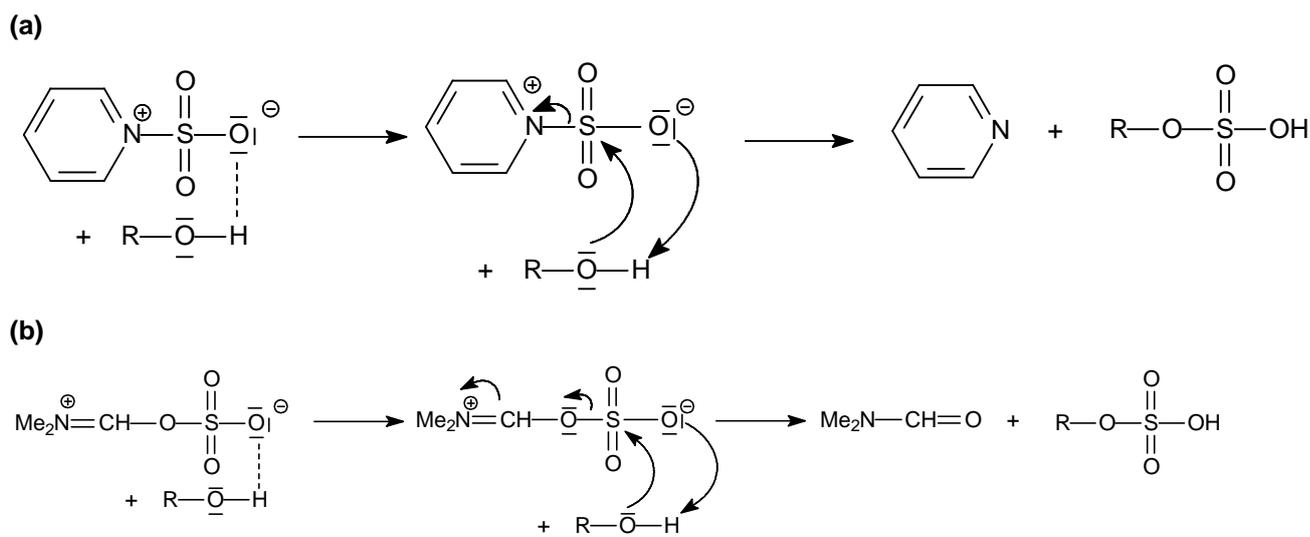


Figure 2 : Mécanisme de sulfatation par les complexes (a) Pyr-SO₃ (b) DMF-SO₃

Toute trace d'eau doit être évitée lors de la réaction de sulfatation. En effet, l'eau éventuellement présente lors de la réaction peut réagir avec le complexe pour donner de l'acide sulfurique. Deux problèmes se posent alors : d'une part, la sulfatation est moins efficace car l'agent de sulfatation est détruit et, d'autre part, l'acide formé peut contribuer à la dépolymérisation de l'EPS. Un soin particulier a donc été apporté pour que la réaction soit réalisée dans les conditions les plus anhydres possibles : utilisation de DMF anhydre, atmosphère saturée en azote, tamis moléculaire, verrerie placée préalablement au dessiccateur et utilisation de polysaccharide lyophilisé juste avant la réaction. La réaction de sulfatation en présence de complexe de SO_3 a été réalisée dans les conditions de Nishino *et al* [9] qui avait déjà été expérimentée par l'Ifremer pour la sulfatation d'EPS de faibles masses molaires (dépolymérisés par catalyse métallique) par le complexe Pyr- SO_3 [10,11]. Des essais ont également été réalisés avec un protocole [12] proposant l'utilisation de l'acide chlorosulfonique dans la pyridine pour sulfater les polysaccharides avec un meilleur taux de sulfatation.

b) Analyses

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la quantité de sulfates parmi lesquelles des méthodes gravimétriques, des méthodes turbidimétriques, la détermination par spectrophotométrie, la titration par conductimétrie, la spectroscopie par RMN ou encore la chromatographie ionique.

Ces méthodes présentent le défaut, à l'exception de la RMN, d'être destructives vis-à-vis de l'échantillon. De plus, une méthode simple comme le test à l'acétate de baryum, qui permet de détecter des quantités de sulfates libres en solution, n'a pu être utilisée en raison de la trop grande quantité en acide uronique et du risque d'interférence des cations associés [13].

Nous nous sommes donc principalement focalisés sur une autre méthode : la spectroscopie infrarouge.

- Analyses infrarouges (IR)

Les travaux de Lijour *et al* [14] ont montré qu'il était possible de réaliser une estimation semi quantitative du taux de sulfates par IR. Cette technique nous a paru intéressante puisqu'elle est rapide, non destructive et que seuls quelques milligrammes de produit sont nécessaires.

En comparant les spectres avant et après sulfatation (figure 3), des différences significatives sont observées dans les régions $1750\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, $1200\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ et aux faibles fréquences en dessous de 900 cm^{-1} . Les 2 bandes d'absorption caractéristiques des échantillon sulfatés se situent à : 1250 cm^{-1} pour la vibration antisymétrique des S=O, 820 cm^{-1} pour la vibration symétrique des C-O-S associée à celle du groupe C-O- SO_3 (léger épaulement à 850 cm^{-1}).

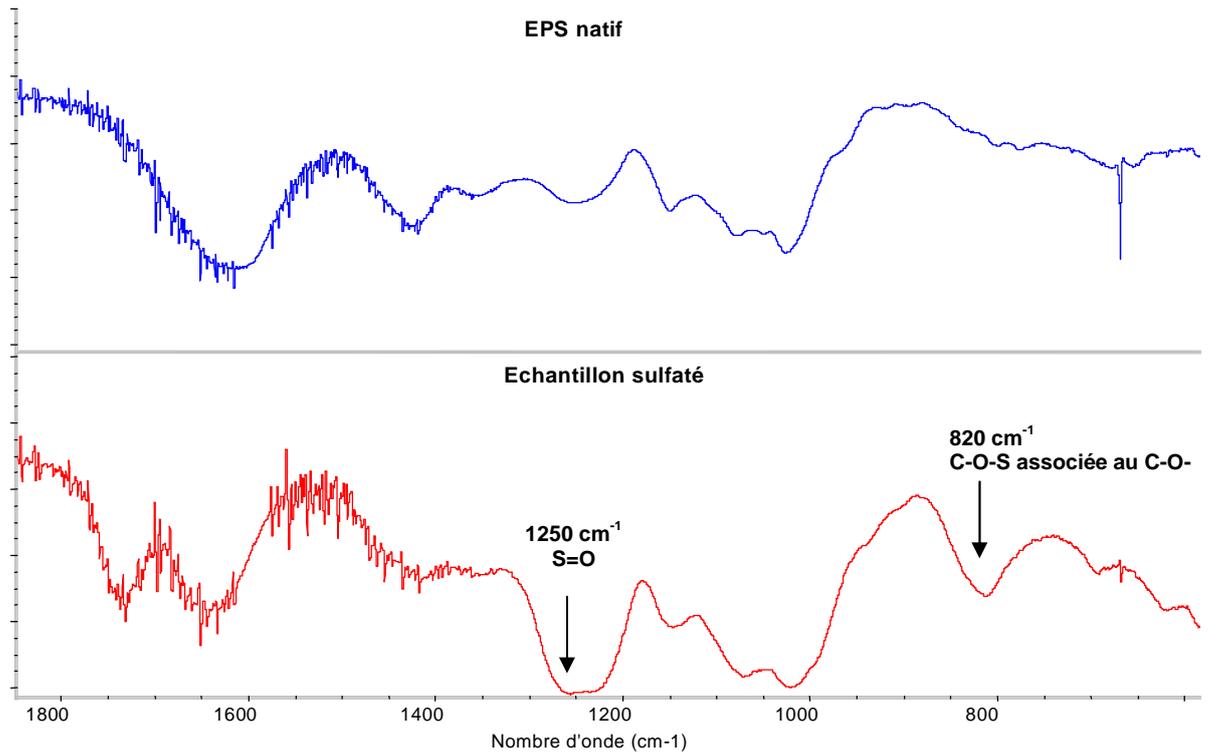


Figure 3 : Comparaison des spectres infrarouges obtenus avant et après sulfatation

La bande à 1050 cm^{-1} représentant les vibrations du squelette du polysaccharide a été choisie comme référence pour quantifier la sulfatation. L'absorbance des bandes à 1050 et 1250 cm^{-1} a été déterminée en utilisant la ligne de base la plus probable (figure 4).

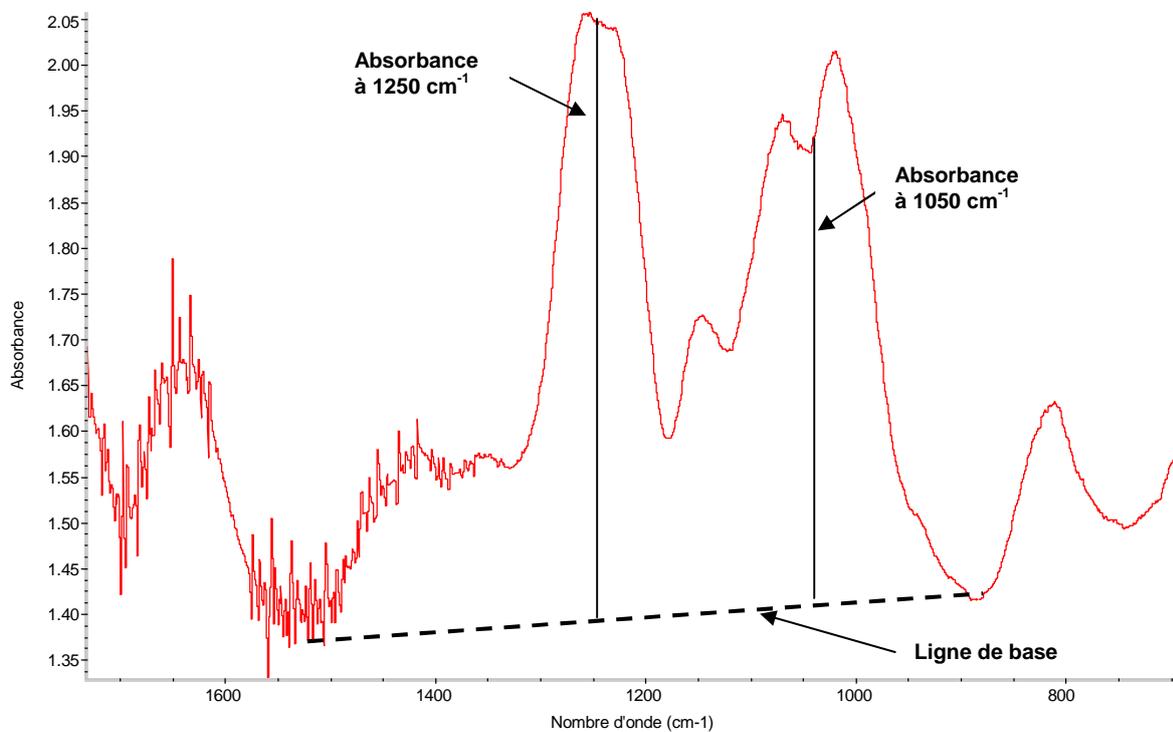


Figure 4 : Evaluation de la sulfatation de l'EPS par analyse graphique du spectre IR

Une droite de corrélation entre le rapport des intensités à 1250 et 1050 cm^{-1} et le taux de sulfate réalisée avec une trentaine d'échantillons (exopolysaccharides et algues) a été utilisée (figure 5) pour déterminer le taux de sulfates [14].

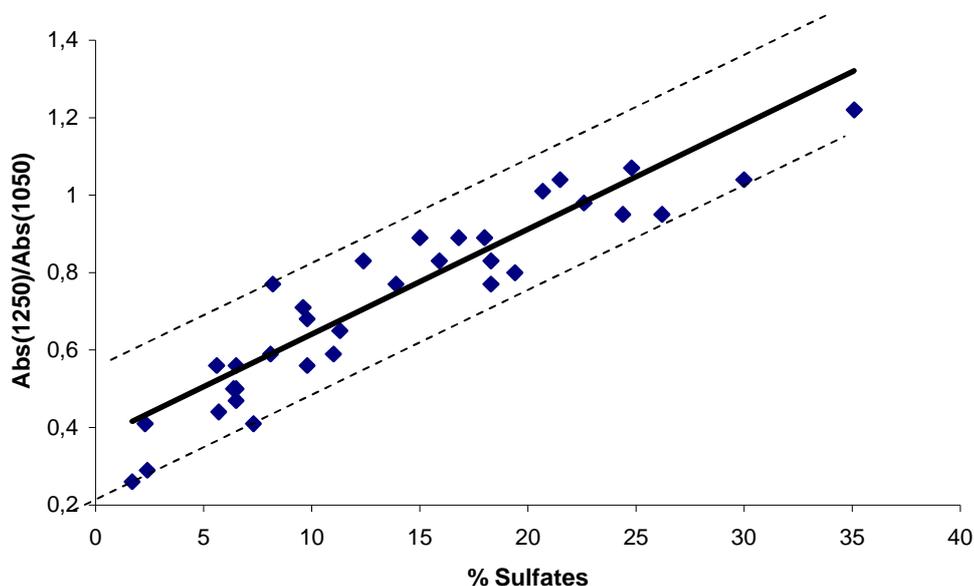


Figure 5 : Droite de corrélation entre les ratios des absorbances à 1250 et 1050 cm^{-1} et le pourcentage de sulfates des polysaccharides. Les lignes en pointillées représentent l'intervalle de confiance.

Ces résultats ont par la suite été confirmés par des analyses élémentaires du soufre.

- **Analyses élémentaires**

Les microanalyses élémentaires ont été réalisées au CRMPO de Rennes. Les analyses ont été triplées. La quantité de SO_3Na est obtenue en multipliant par 3,22 le pourcentage de soufre. Cette technique permet un dosage très précis du soufre dans un polysaccharide mais ne permet pas de différencier les sulfates liés au polymère des sulfates libres qui n'ont pas été éliminés lors de la purification. Néanmoins, des études menées précédemment à l'Ifremer [15] ont montré que, dans nos conditions de purification, le dosage des sulfates libres par chromatographie d'échanges d'ions (méthode Dionex®) permet d'affirmer que l'EPS sulfaté contient moins de 3% de sulfates libres. Les résultats obtenus ont montré que la détermination du taux de sulfates par analyses infrarouge avait une précision de $\pm 5\%$.

- **Détermination des masses molaires**

La masse molaire exprimée en équivalents pullulanes permet d'estimer d'éventuelles modifications de la masse sur les chaînes polysaccharidiques. Cependant, l'apport de groupements sulfates modifie considérablement la conformation et la charge globale de ce dérivé. La valeur de la masse donnée par ce système est donc intrinsèquement erronée et ne permet donc qu'une évaluation qualitative de la dégradation ou pas de l'EPS modifié.

c) Résultats et discussions

Le polysaccharide HYD 657 n'étant pas soluble dans les solvants organiques, celui-ci a dû préalablement être mis sous forme de sels de bases organiques. Les sels de pyridinium préparés ont

montré une bonne solubilité dans le DMF, même à température ambiante, et ont donc été retenus pour cette étude.

- Sulfation en présence de Pyr-SO₃ de dérivés de faibles masses molaires obtenus par catalyse métallique

Les premiers essais de sulfation ont été réalisés après dépolymérisation par catalyse métallique de l'EPS. Dans nos essais, nous nous sommes basés sur les conditions qui avaient été utilisées précédemment à l'Ifremer lors des travaux de thèse d'Olivier Roger [11,15] pour sulfater les EPS GY 785 et HE 800 dont les structures sont décrites dans la première partie de ce mémoire, mis préalablement sous forme de sels de pyridinium, par le complexe Pyr-SO₃. Cinq équivalents en masse du complexe Pyr-SO₃ par rapport à l'EPS sont introduits dans une solution d'EPS. Le mélange a été placé 24h sous agitation à 45°C. Les résultats que nous avons obtenu ont été comparés à ceux qui avaient été observées pour les GY 785 et HE 800 dans le tableau 1. Le degré de substitution (DS) indiqué dans le tableau se définit comme le nombre moyen de sites substitués par unité répétitive et par ose.

EPS	Sulfation	SO ₃ Na (%) ^a	DS	M _w (g/mol) ^b	Rendement (%) ^c
HYD 657 CM	Avant	5	-	42 000	-
	Après	30,6	0,9	19 000	100
GY 785 CM	Avant	8,2	0,1	17 000	-
	Après	40	1,2	13 400	87
HE 800 CM	Avant	>1	-	10 000	-
	Après	24,6	0,4	7 900	<100

Tableau 1 : Caractéristiques des dérivés sulfatés obtenus à partir de l'EPS HYD 657 dépolymérisés par catalyse métallique (CM) comparées à celles obtenues précédemment pour les EPS GY 785 et HE 800 [15] ^a déduit du taux de soufre obtenu en micro-analyse élémentaire ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ.

Les analyses structurales réalisées n'ont pas mis en évidence la présence de groupements sulfates sur l'unité répétitive (travaux non publiés d'Hélène Rougeaux) contrairement à l'EPS GY 785 sulfaté à l'état natif. Les analyses élémentaires ont cependant révélé la présence de sulfate dans la composition de l'EPS HYD 657 à un taux estimé à 5%.

La sulfation de l'EPS HYD 657 conduit à des dérivés sulfatés à environ 31%. Ce taux de sulfation est plus important que celui obtenu pour l'EPS HE 800. Cette différence de réactivité peut s'expliquer simplement en regardant de plus près les structures de ces deux EPS : l'EPS HYD 657 possède plus de groupements OH primaires et secondaires libres pouvant être sulfatés. Ainsi, le calcul des degrés de substitution donne un degré maximum de 2 pour le HE 800 contre 2,5 pour l'EPS HYD 657.

A partir du taux de sulfates, le nombre de groupements sulfates par unité répétitive a pu être estimé. D'après l'hypothèse de structure de l'HYD 657, la masse molaire de l'unité répétitive est de 1847 g.mol⁻¹. Une valeur de 30,6% de SO₃Na en masse représente environ 10 sulfates par unité répétitive. L'unité répétitive sulfatée possède alors une masse de 2661 g.mol⁻¹. Si 10 hydroxyles sur

les 27 possibles, dans l'hypothèse de structure proposée, sont sulfatés seuls 37% des hydroxyles sont sulfatés. Ainsi, l'unité répétitive de l'EPS HYD 657 comportant 11 unités monosaccharidiques, le degré de sulfatation (DS) est donc de 0,9.

La plus grande réactivité de l'EPS GY 785 par rapport à l'EPS HYD 657 semble plus difficile à justifier. En effet, bien que le GY 785 possède théoriquement moins de groupements OH pouvant être sulfatés que l'EPS HYD 657, les mêmes proportions entre les OH primaires et secondaires sont observées [16] et cet EPS est également encombré du fait de la présence de ramifications.

La complexité de la structure du polymère HYD 657 ne peut pas permettre (27 positions de sulfatation possibles sur une unité répétitive) une identification des positions privilégiées lors de la sulfatation. De plus, cette complexité pourrait être renforcée par l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles, et par conséquent du nombre de positions de sulfatation, lors de phénomènes de dépolymérisation accompagnant la réaction de sulfatation.

Pour observer plus facilement le phénomène de dégradation et/ou dépolymérisation avec la colonne HPSEC PL-aquagel, un échantillon de masse molaire un peu plus important a été utilisé par rapport aux autres EPS. Une diminution de la masse molaire est observée pour l'EPS HYD 657 dont la M_w est divisée par 2 malgré un apport important en groupements sulfates. Enfin il convient de rappeler que l'apport de plus de 30% de sulfates modifie considérablement la conformation et la charge du dérivé : la valeur de la masse donnée en équivalents pullulanes est donc erronée. La mise en évidence d'un phénomène de dégradation a donc dû être confirmée par la suite.

- **Sulfatation en présence de Pyr-SO₃ d'échantillons natifs et dépolymérisés sous ultrasons**

Par la suite, nous nous sommes consacrés à la sulfatation d'échantillons de plus hautes M_w : l'EPS natif et l'EPS dépolymérisé sous ultrasons d'une M_w d'environ 300 000 g/mol (manipulations de Grenoble). Le but affiché était d'obtenir des échantillons sulfatés de différentes masses molaires mais également de partir d'un produit de départ plus facile d'obtention et plus « propre » que celui obtenu après dépolymérisation par catalyse métallique.

Les échantillons préalablement mis sous forme de sels de pyridinium ont été de la même façon sulfatés par le complexe Pyr-SO₃. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux qui avaient été observés pour des échantillons dépolymérisés par catalyse métallique (tableau 2).

EPS	Sufatation	SO ₃ Na (%) ^a	DS	M _w (g/mol) ^b	Rendement (%) ^c
HYD 657 CM	Avant	5	-	42 000	-
	Après	32	0,9	19 000	100
HYD 657 US	Avant	5	-	300 000	-
	Après	26	0,6	37 000	>100
HYD 657 Natif	Avant	5	-	3 000 000	-
	Après	23	0,5	23 000	74

Tableau 2 : Caractéristiques des dérivés sulfatés obtenus à partir de l'EPS HYSD 657 natif et dépolymérisés par catalyse métallique (CM) et ultrasons (US) ^a déduit par IR ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ

A temps de réaction constant, les taux de sulfatations obtenus pour les plus fortes masses molaires, EPS natif et dépolymérisé sous ultrasons, sont moins élevés, d'environ 5%, que ceux

observés pour les échantillons dépolymérisés par catalyse métallique. Des facteurs tels que la viscosité en début de réaction peuvent être avancés pour expliquer cette diminution de la réactivité.

Le niveau de dépolymérisation lors de la réaction de sulfatation a été évalué pour ces manipulations : les masses molaires finales sont de l'ordre de celles qui ont été obtenues en catalyse métallique (20-50 000 g/mol). Plusieurs réactions sont probablement impliquées dans le phénomène de dépolymérisation lors de la sulfatation :

- L'hydrolyse acide : les traces d'eau présentes peuvent réagir avec le complexe pour former de l'acide sulfurique. L'acide contribue alors à la dépolymérisation suivant le mécanisme évoqué dans la partie 2 de ce mémoire.
- Des réactions de déshydratation des groupements hydroxyles par SO_3 sont également possibles dans nos conditions [17].

Les pics obtenus en HPSEC après dialyse sont fins, avec des indices de polydispersité de l'ordre de 1,5. Les phénomènes de dégradation et/ou dépolymérisation peuvent également être mis en évidence par la formation d'une nouvelle bande de vibration en IR (figure 3) correspondant à la formation de groupements carbonyles.

L'influence des groupements sulfates sur la libération des monosaccharides lorsque ceux-ci sont hydrolysés ou triméthylsilylés lors des analyses CPG n'a pas permis la détermination des ratios en monosaccharides [18]. Aucune hypothèse concernant un site de clivage privilégié lors de la sulfatation n'a donc pu être émise.

- **Sulfatation de l'EPS HYD 657 par de l'acide chlorosulfonique dans de la pyridine**

Des études menées sur la sulfatation d'EPS de microalgues rouges [19] ont montré que le mélange HClSO_3 /pyridine permettait d'obtenir un meilleur taux de sulfatation.

Les conditions mises en place par Geresh et al [19] ont donc été appliquées à l'EPS HYD 657. L'utilisation de la pyridine comme solvant permet, d'une part, une bonne homogénéité du milieu réactionnel tout en évitant les phénomènes d'hydrolyse acide.

Des taux de sulfatation supérieurs à 30% ont été obtenus mais avec de mauvais rendements (de l'ordre de 20%). L'EPS sulfaté obtenu par cette voie possède une M_w inférieure à 10 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et apparaît plus polydisperse que celui obtenu en présence du complexe Pyr-SO_3 . Cette voie de sulfatation n'a donc pas été poursuivie.

- **Sulfatation de l'EPS HYD 657 en présence de DMF-SO_3**

L'ajout du complexe DMF-SO_3 semble intéressant pour deux raisons principales :

- La plus grande réactivité des complexes de DMF par rapport à ceux de la pyridine. Cette différence de réactivité s'explique par leur plus faible stabilité induite par leur plus faible basicité ;
- Une moins grande toxicité attendue en vue d'applications biologiques [20], du fait de l'absence effective de pyridinium dans le produit final.

Des manipulations ont donc été réalisées en substituant l'ajout de Pyr-SO_3 par la même quantité massique de DMF-SO_3 , soit 5 fois la masse de polysaccharide natif, selon le même protocole. L'effet de différents solvants (DMF, DMSO, sulfolane, présence de pyridine) sur la sulfatation a également été testé, toujours dans les mêmes conditions de concentration du protocole initial. Les résultats des

différentes manipulations de sulfatation réalisées sur l'HYD 657 natif en présence de DMF-SO₃ figurent dans le tableau 3.

N°	Sel	Température (°C)	Solvant	SO ₃ Na (%) ^a	DS	M _w (g/mol) ^b	Rendement (%) ^c
HYD 657 natif	Ca	-	-	5	-	3 000 000	-
1	Pyr	45	DMF	34	1,1	18 000	48
2	Pyr	Ambiante	DMF	21	0,5	43 000	70
3	Pyr	45	DMF + 2 ml pyridine	34	1,1	670 000	90
4	Na	45	DMF	8	nd	15 000	25
5	Pyr	45	DMSO	5	-	< 10 000	< 10%
6	Pyr	45	Sulfolane	5	-	< 10 000	< 10%

Tableau 3 : Caractéristiques des dérivés sulfatés obtenus à partir de l'EPS HYSD 657 pour différents sels, dans différentes conditions de température et de solvants ^a déduit par IR ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ

L'ajout de complexe DMF-SO₃ (entrée 1, tableau 3) dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment pour le complexe Pyr-SO₃ (ajout de 5 fois la masse en complexe, à 45 °C pendant 24h) a permis d'obtenir des fractions présentant un meilleur taux de sulfatation de 34% contre 23% avec le complexe Pyr-SO₃, mais tout aussi dépolymérisées. Le rendement obtenu est plus faible ce qui doit traduire la formation de fractions de faibles masses molaires éliminées lors de l'étape de dialyse.

Des études réalisées sur le pullulane [21] ont montré que la sulfatation avec le complexe DMF-SO₃ pouvait être réalisée à des températures beaucoup plus basses (20°C contre 70°C) qu'avec le complexe Pyr-SO₃. Afin de limiter la dégradation de l'EPS lors de la sulfatation, des manipulations ont été réalisées à température ambiante (entrée 2, tableau 3). Les échantillons obtenus sont moins sulfatés et sont toujours très dépolymérisés. L'amélioration observée est faible : 43 000 contre 18 000 g/mol à 45°C.

Les résultats obtenus précédemment ont montré une dépolymérisation importante de l'échantillon pendant la sulfatation. Afin de limiter les phénomènes d'hydrolyse acide, de la pyridine (2 ml) a été ajoutée au milieu réactionnel en début de réaction (entrée 3, tableau 3). Cet ajout de pyridine a permis de diminuer considérablement les phénomènes de dépolymérisation avec des masses molaires après 24h de réaction d'environ 650 000 g/mol tout en gardant un taux de sulfate élevé d'environ 34%.

L'intérêt principal au niveau toxicologique dans l'utilisation de DMF-SO₃ est de ne pas produire une pollution de l'EPS sulfaté par des sels de pyridiniums (participant à la couleur beige du produit sulfaté) qui sont difficiles à éliminer lors de dialyses ou de chromatographies échangeuses d'ions. Une étude par spectroscopie UV-visible a été réalisée pour vérifier cet intérêt. En effet, les spectres UV des sels de pyridinium révèlent des pics caractéristiques dans la région 250-265 nm. Les spectres UV réalisés pour les échantillons obtenus par sulfatation par le complexe Pyr-SO₃ et DMF-SO₃ révèlent tous deux une pollution par les sels de pyridinium. Dans le cas de l'ajout de complexe du DMF-SO₃ cette pollution est attribuable à l'utilisation de l'EPS sous forme de sels de pyridinium. De nouvelles études ont été réalisées avec l'ajout de sels de sodium de l'EPS HYD 657 (entrée 4, tableau 3).

Comme attendu, ce sel de sodium de l'HYD 657 s'est révélé beaucoup moins soluble dans le DMF. La sulfatation a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. La sulfatation de l'HYD 657 sous forme de sels de sodium forme un mélange peu homogène qui ne conduit qu'à une très faible sulfatation (<10%).

Des essais ont également été réalisés pour d'autres solvants aprotiques dipolaires : le DMSO et le sulfolane.

Des manipulations ont tout d'abord été réalisées dans le DMSO afin de voir l'effet du solvant sur la sulfatation. En effet, le solvant utilisé peut avoir un effet important sur la solubilité et la conformation du polysaccharide en solution avec la création de liaisons intermoléculaires solvant-polysaccharide (figure 6) [22].

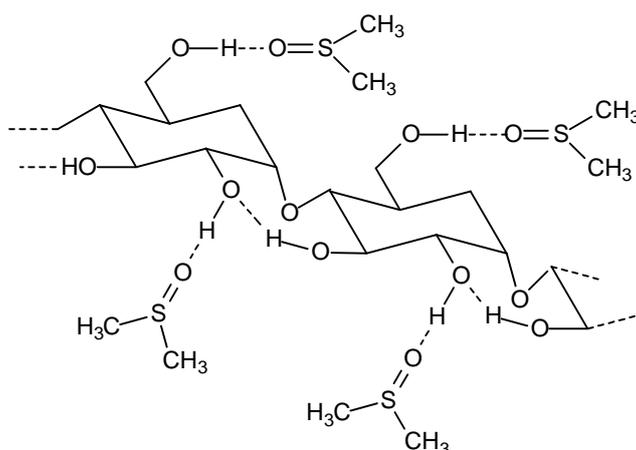


Figure 6 : Possibilité de liaisons intermoléculaires solvant-polysaccharide dans le DMSO [23]

Le mécanisme de sulfatation présenté en figure 2 révèle également la nécessité d'une forte nucléophilie des atomes d'oxygène du polysaccharide pour obtenir des taux importants de sulfates. Dans le DMSO, les atomes d'oxygènes des groupements hydroxyles de l'EPS possèdent une densité électronique et des propriétés nucléophiles plus fortes que dans le DMF. Ils peuvent facilement attaquer les atomes de soufre électropositifs du complexe DMF-SO₃. De plus, le plus grand volume molaire du DMF comparé à celui du DMSO peut freiner la réaction entre les groupements hydroxyles et le complexe. Les essais (entrée 5, tableau 3) n'ont pas permis de montrer un meilleur taux de sulfatation dans le DMSO. Le rendement observé est également inférieur à 10%. Une plus forte dégradation de l'EPS pendant la sulfatation est donc observée dans le DMSO par rapport au DMF.

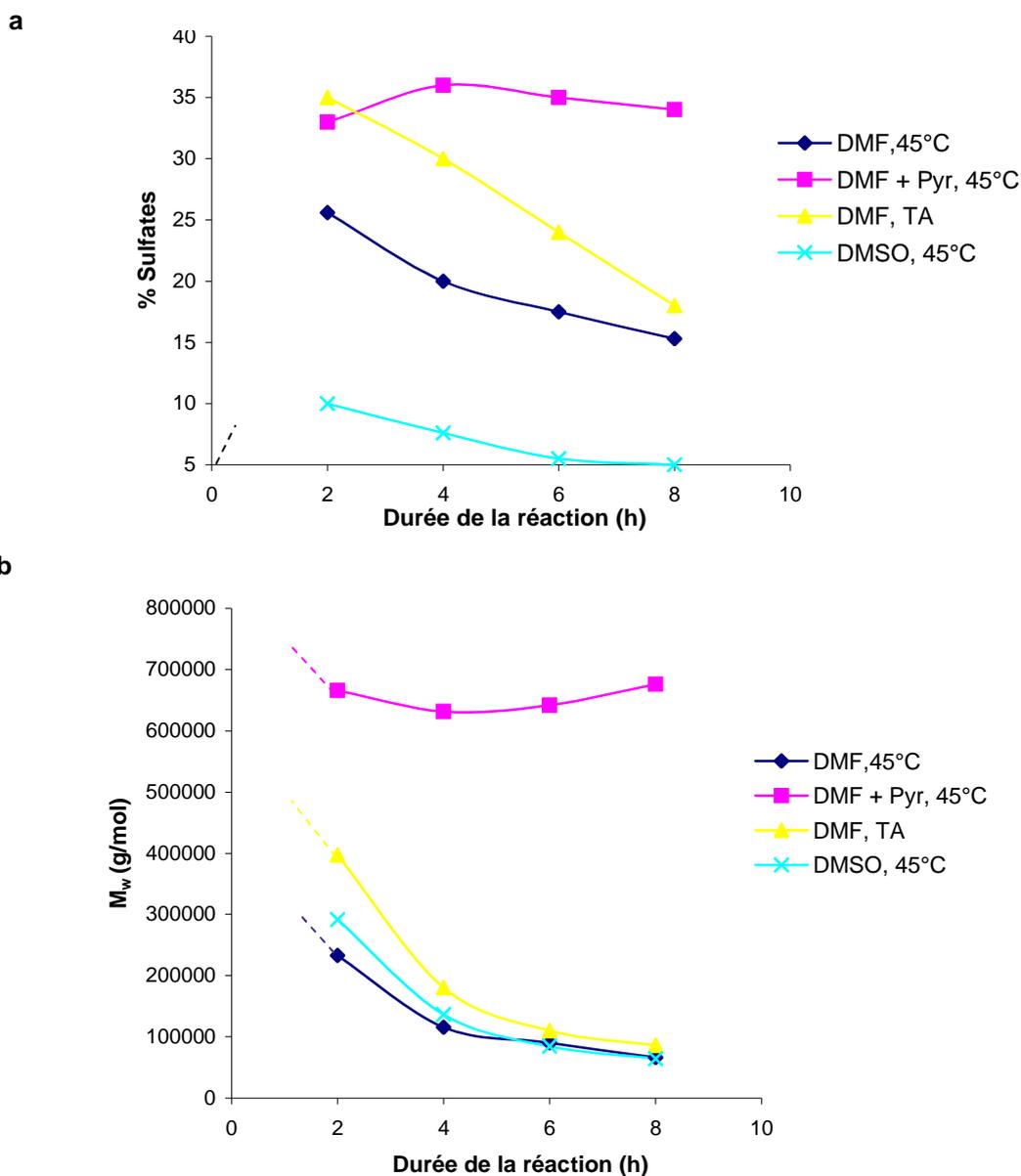
Il a paru également important, dans l'optique d'une possible industrialisation de cette manipulation, de commencer à réfléchir à l'utilisation d'un solvant moins toxique que le DMF. Des premiers essais (entrée 6, tableau 3) ont été réalisés avec le sulfolane (tétraméthylène sulfone) préconisé dans les études toxicologiques pour remplacer le DMF. Le sulfolane possède une constante diélectrique proche ($\epsilon = 37$) de celle du DMF ($\epsilon = 43$). Les résultats obtenus sont semblables à ceux du DMSO concernant la dégradation de l'EPS : l'échantillon est également de trop faible masse molaire pour être dialysé après sulfatation avec les membranes de seuil de coupure 12-14 000 g/mol utilisées habituellement. De plus, le sulfolane s'est révélé beaucoup plus difficile à éliminer. En effet, même après dialyse et lyophilisation, l'odeur caractéristique du sulfolane est toujours présente.

De nouvelles manipulations afin de trouver un solvant plus approprié seront nécessaires dans le cas d'une industrialisation de l'EPS sulfaté.

- Cinétiques de sulfatation en présence de DMF-SO₃

Dans les expériences précédentes, une plus grande dépolymérisation accompagne les échantillons les plus sulfatés. La durée de la réaction avait été fixée à 24h par rapport aux études antérieures menées au laboratoire sur des échantillons dépolymérisés par catalyse métallique. Des cinétiques (figures 7) ont été réalisées, pour l'ajout de DMF-SO₃, dans les premières heures de la sulfatation afin de voir si l'optimisation de la durée de la réaction pouvait permettre de limiter la dépolymérisation en gardant les mêmes taux de sulfates. Différentes conditions ont été utilisées :

- Conditions standards : à 45°C dans le DMF ;
- Condition standards avec ajout de pyridine (2 ml) ;
- Température ambiante dans le DMF ;
- Manipulation réalisée dans le DMSO à 45°C.



Figures 7 : Evolution du taux de sulfates (**a**) et de la masse molaire (**b**) pendant les premières de sulfatation pour différentes conditions de solvant et de température (à température ambiante TA et à 45°C)

Pour les manipulations réalisées en présence de DMF, seul, à 45°C et à température ambiante, des diminutions du taux de sulfates (figure 7a) et de la masse molaire (figure 7b) ont été observées entre la 2^{ème} et la 8^{ème} heure de réaction. Ces diminutions sont plus importantes dans les quatre premières heures pour la réaction réalisée à 45°C qu'à température ambiante, les résultats des manipulations réalisées à 45°C et à température ambiante tendent ensuite vers les mêmes résultats avec des pourcentages en sulfate de 15-20% et des M_w d'environ 80 000 g/mol après 8 h de réaction.

En présence de pyridine, les phénomènes de dégradation/dépolymérisation semblent diminuer en début de manipulation. Ainsi, la masse molaire et le taux de sulfate restent constants avec respectivement une M_w d'environ 650 000 g/mol et un taux de sulfate d'environ 35% (DS~1,1). La basicité apportée par la pyridine permet donc un meilleur contrôle des phénomènes de dépolymérisation.

Les manipulations réalisées dans le DMSO n'ont pas permis d'obtenir de bons taux de sulfatation. La diminution de la masse molaire est, quant à elle, semblable à ce qui a été observé dans d'autres conditions en l'absence de pyridine.

Les conditions expérimentales retenues ont permis de sulfater l'EPS HYD 657 avec un degré de substitution d'environ 1,1 et ceci même dans le cas de l'EPS natif de très haute masse molaire. Ainsi, le complexe DMF-SO₃ s'est révélé être un meilleur agent sulfatant que le Pyr-SO₃ plus communément utilisé. Des cinétiques de la réaction ont permis d'optimiser les conditions à l'EPS HYD 657 afin de trouver le meilleur compromis entre le taux de sulfatation obtenu et la dépolymérisation observée. Les cinétiques réalisées dans les premières heures de la réaction ont révélé que le taux de sulfatation de l'échantillon natif était maximum après 2h de réaction et que l'allongement de la réaction conduisait à sa dépolymérisation et à la diminution de son taux de sulfates. Les manipulations réalisées ont également mis en évidence que l'ajout de pyridine permettait de limiter considérablement les phénomènes de dépolymérisation tout en conservant un taux de sulfatation élevé (34%).

2.2- Phosphatation

Les esters de phosphate jouent un rôle essentiel dans la physiologie des cellules et sont par conséquent essentiels à l'organisme. La fixation de groupements phosphates pour l'obtention de nouveaux actifs pharmaceutiques biologiquement actifs fait l'objet de nombreuses études [24]. Ainsi la phosphatation de fucoïdanes, de κ -carraghénanes ou de xylanes, confère à ces polysaccharides des propriétés anticoagulantes [25]. L'ajout de groupements phosphates a également été largement utilisé pour modifier les propriétés de l'amidon en particulier au niveau rhéologique, de la rétention d'eau et de la chélation de métaux [26].

a) La réaction de phosphatation

La phosphatation de l'EPS HYD 657 a été réalisée directement sur l'EPS natif ou sur l'EPS dépolymérisé sous ultrasons (échantillon de Grenoble de $M_w \approx 300\ 000$ g/mol).

Dans la littérature, la phosphatation des polysaccharides est généralement réalisée en présence de réactifs inorganiques, comme l'acide phosphorique (H₃PO₄), l'oxyhalogénure de phosphore (POCl₃), le

pentoxyde de phosphore (P_2O_5) ou encore le tripolyphosphate ($Na_5P_3O_{10}$) ou le pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$).

La phosphorylation des fonctions hydroxyles a été réalisée suivant le protocole de Khanal *et al* [27], dans le DMF, en présence d'urée et d'acide orthophosphorique. Cette voie de phosphorylation avait déjà fait l'objet d'études préliminaires sur les EPS GY 785 et HE 800 lors de la thèse d'Olivier Roger [15].

La réaction de phosphorylation a lieu selon le mécanisme présenté en figure 8. Les études menées en RMN du ^{13}C et ^{31}P lors de la phosphorylation du chitosan [28] ont montré que la fixation de groupements phosphates se fait majoritairement sur les fonctions hydroxyles primaires qui sont plus réactives que les secondaires.

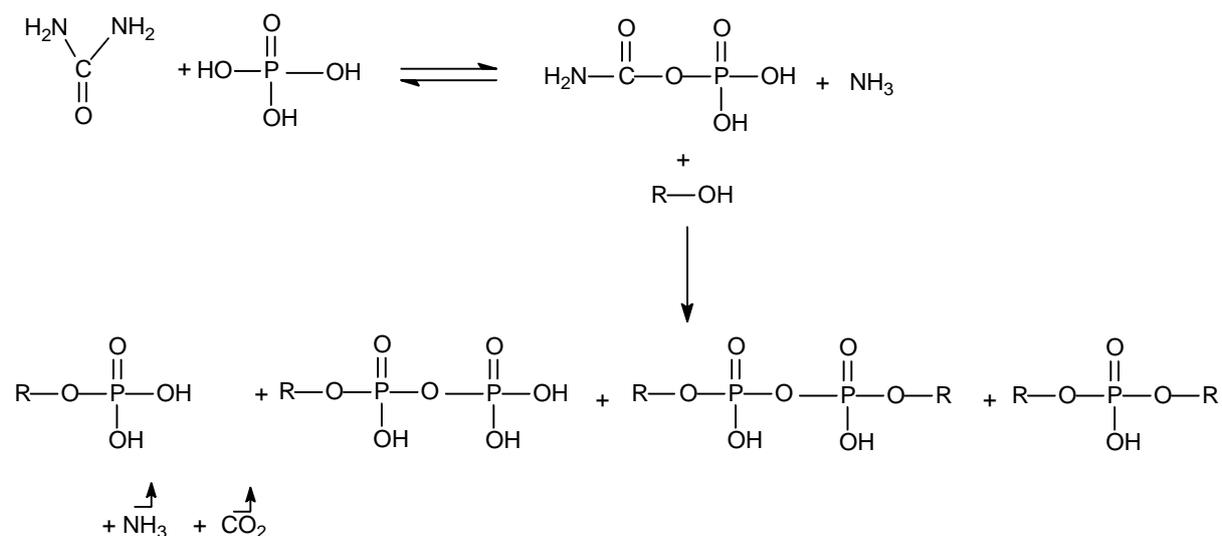


Figure 8 : Mécanisme de phosphorylation des hydroxyles de l'EPS en présence d'urée et d'acide orthophosphorique

La réaction de phosphorylation peut mener à la formation de liaisons monophosphoesters, diphosphoesters, mais également de liaisons phosphodiester et (di) phosphodiester entre les chaînes polysaccharidiques mais, probablement, également entre des résidus polysaccharidiques d'une même chaîne. La formation des différents composés est influencée par les conditions de réactions : proportions relatives entre le polysaccharide, l'acide phosphorique et l'urée, température et durée de la réaction [26]. Un excès d'urée est nécessaire, en effet, pour des quantités trop faibles car une dégradation due à l'hydrolyse acide des polysaccharides est observée. Dans le cas de l'amidon, au moins 3 équivalents d'acide phosphorique sont nécessaires en urée pour obtenir une fonctionnalisation satisfaisante.

b) Analyses

Afin d'optimiser les manipulations, nous avons cherché à valider des méthodes simples nous permettant d'obtenir rapidement et simplement les résultats de caractérisation et de quantification des manipulations de phosphorylation.

- **Analyses infrarouges (IR)**

En comparant les spectres avant et après sulfatation (figure 9), des différences significatives sont observées. Les 2 bandes d'absorption caractéristiques des échantillons phosphatés se situent à $1150-1185\text{ cm}^{-1}$ pour la vibration d'élongation des P=O et à $950-1055\text{ cm}^{-1}$ pour la vibration d'élongation des C-O-P. Une autre bande apparaît également sous forme d'épaulement à 1710 cm^{-1} , celle-ci est caractéristique des C=O des amides.

Cette technique n'a pas permis pour les réactions de phosphatation de quantifier le taux de phosphates. En effet, nous ne possédons pas les polysaccharides phosphatés de référence nécessaires à la réalisation d'une courbe de calibration.

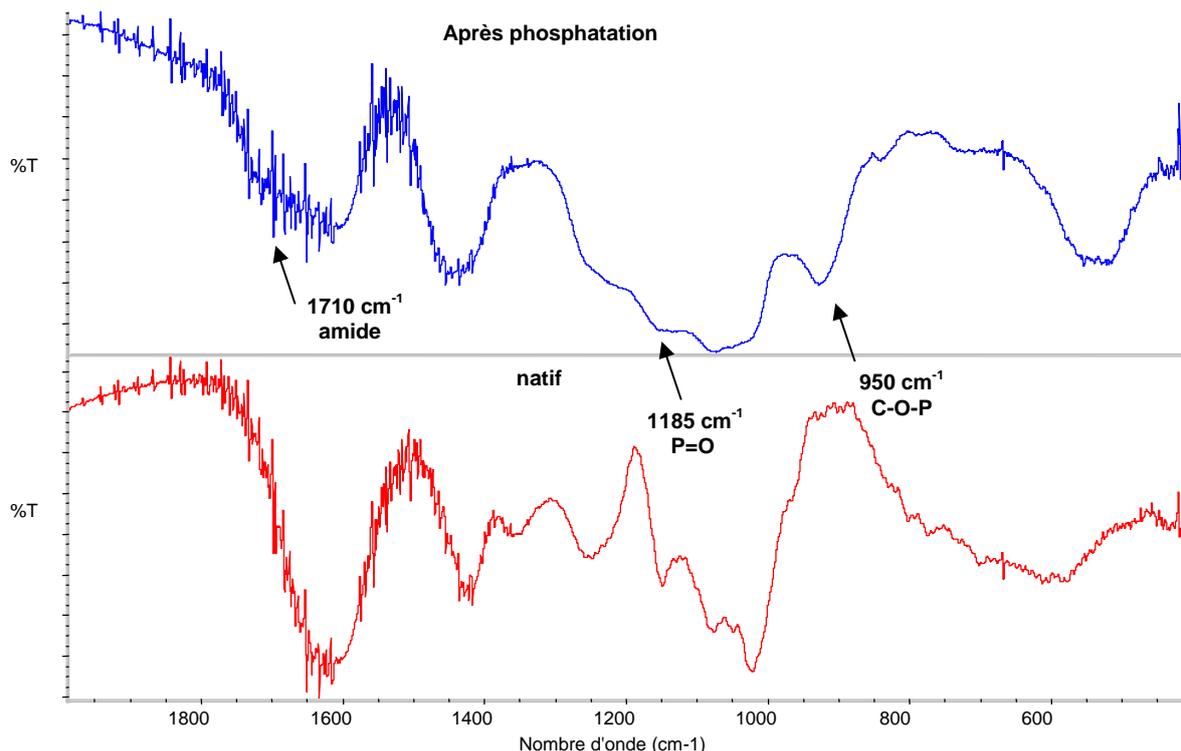


Figure 9 : Comparaison des spectres infrarouges obtenus avant et après phosphatation

- **Dosages colorimétriques**

Des essais de dosage des phosphates totaux par colorimétrie en utilisant un réactif molybdique selon un protocole adapté des conditions d'Ames [29] ont été réalisés. Les premiers résultats obtenus se sont révélés aléatoires et non reproductibles. Ces manipulations n'ont pas été poursuivies.

- **Analyses élémentaires**

Les microanalyses élémentaires ont été réalisées au Service Central d'analyse de Vernaison. Cette technique permet un dosage très précis du phosphore dans un polysaccharide mais ne permet pas de différencier les phosphores liés au polymère des phosphores libres qui n'ont pas été éliminés lors de la purification. Néanmoins, il est à noter que le dosage des anions réalisés pendant la thèse d'Oliver Roger [15] n'indiquait qu'un très faible pourcentage de phosphates libres (<1%) après purifications. On peut noter que toutes les analyses ont été triplées lors de cette étude.

D'autre part, il est évident que les analyses élémentaires ne peuvent permettre un suivi rapide et régulier des essais d'optimisation sur les conditions de réaction : nous avons donc essayé de mettre en place une nouvelle méthode de quantification des phosphates, cette fois-ci par RMN.

- RMN ³¹P

La RMN du phosphore permet la mise en évidence des différents produits de phosphorylation. Deux massifs de signaux sont observés [25,30]. Pour le premier, entre -5 et -11 ppm, aucun shift n'étant observé dans des conditions alcalines, il a été attribué aux liaisons diphosphodiester. Pour le second entre 0 et 5 ppm, les déplacements sont pH-dépendants et ont donc été attribués aux liaisons phosphomonoesters mais également, pour les signaux compris entre 0,4 et 1 ppm, aux liaisons phosphodiesters correspondant à des groupements phosphates liés à une seule chaîne.

Afin de quantifier la phosphorylation, l'utilisation d'un étalon interne a été envisagée. Des étalons inorganiques (Na₂HPO₄ et K₂HPO₄...) ont tout d'abord été testés mais ceux-ci n'ont pas permis d'obtenir le déplacement souhaité. Les étalons inorganiques ont montré une dépendance au pH et des interactions avec les produits à analyser. Un produit organique soluble dans l'eau a donc été recherché. Ainsi, la TPPTS (triphenylphosphine trisulfonée) (figure 10) s'est révélée intéressante pour la réalisation de dosages du phosphore dans nos produits. En effet, le pic obtenu en RMN³¹P possède un shift à -4,7 ppm se situant de façon idéale entre celui du mono et du diphosphodiester (figure 11). Des études complémentaires ont été ensuite réalisées concernant l'importance du temps de relaxation T₁ et de la température afin d'optimiser les spectres obtenus.

La solubilité de nos échantillons phosphorylés s'est révélée variable : pour la quasi-totalité des échantillons, une décantation dans le temps a été observée avec la formation d'un gel. Cette mauvaise solubilité n'a pas permis une bonne quantification de la phosphorylation.

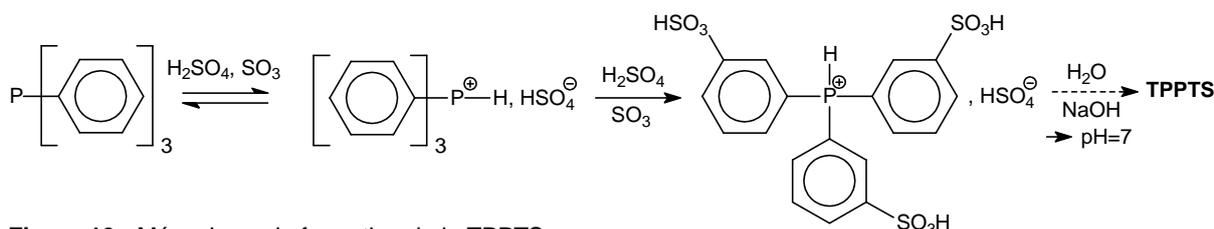


Figure 10 : Mécanisme de formation de la TPPTS

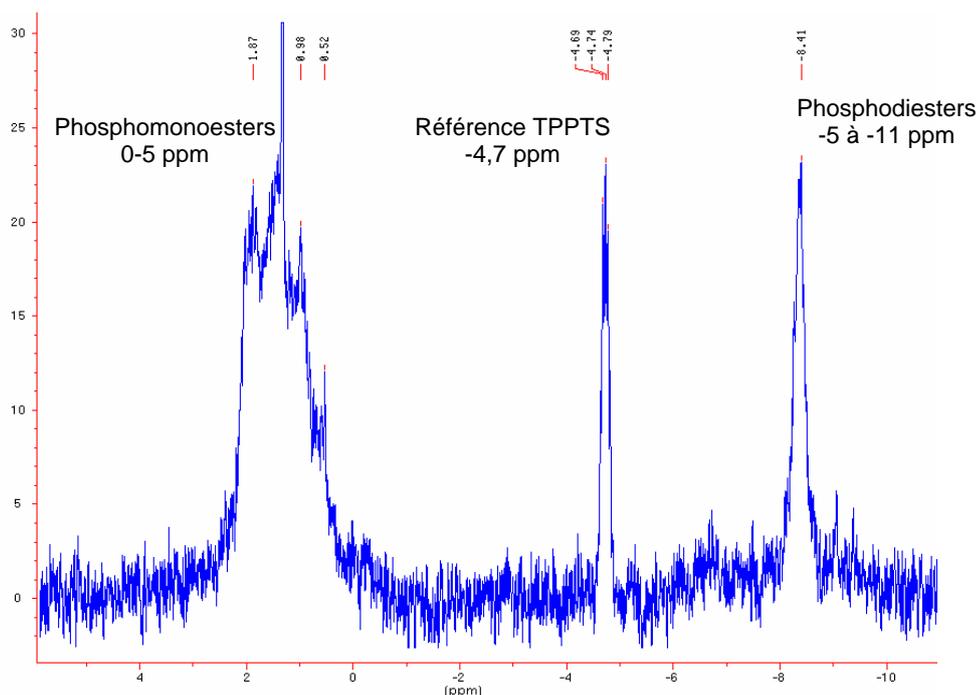


Figure 11 : Spectre RMN type obtenu après phosphorylation de l'EPS HYD 657

- **Détermination de la masse molaire**

Les problèmes posés par l'apport de charges lors de la phosphatation sont les mêmes que ceux soulignés pour l'ajout de sulfates. De plus, les échantillons obtenus se sont montrés partiellement solubles et la détermination des masses molaires n'était donc pas possible. Deux types de populations étaient attendues en HPSEC : une partie de hautes masses molaires due aux possibilités de réticulations et une partie de plus faibles masses molaires comprenant des échantillons dépolymérisés par hydrolyse acide lors de la réaction de phosphatation.

c) Résultats et discussions

Les premiers essais de phosphatation ont été réalisés sur des échantillons dépolymérisés sous ultrasons (US) pour différentes quantités d'acide orthophosphorique. Les résultats des manipulations de phosphatation figurent dans le tableau 4. Des rendements supérieurs à 85% ont été obtenus (entrée 1, tableau 4). Les échantillons phosphatés possèdent des taux de phosphore entre 4,8 et 6,2%. Ces taux sont comparables à ceux qui avaient été obtenus pour l'EPS HE 800 dépolymérisé par catalyse métallique. Contrairement à ce qui était attendu, l'échantillon le plus phosphaté est obtenu pour la moins grande quantité d'acide phosphorique introduite. En RMN, dans les deux cas, la liaison phosphomonoester est représentée de façon majoritaire (environ 80%).

N°	EPS	T (°C)	Durée de la réaction	H ₃ PO ₄ (ml)	% phosphomonoester (% diphosphodiester)
1	US	120	3h30	2	85
	US	120	3h30	1,25	76
2	Natif	120	4h	1,25	80
	Natif	120	4h	1,25	100
	Natif	120	4h	1,25	100
	Natif	125	4h	1,25	27
3	Natif	125	8h	1,25	90
4	Natif	140	4h	1,25	58

Tableau 4 : Ratio obtenu, déduit de la RMN, entre les quantités de phosphomonoester et de diphosphoester pour différentes conditions de réactions (température, durée de la réaction, quantité de H₃PO₄)

Une série de manipulations a ensuite été réalisée dans les mêmes conditions pour vérifier la reproductibilité de la phosphatation. Les résultats obtenus divergent avec des pourcentages en phosphomonoesters par rapport aux diphosphoesters compris entre 27 et 100% (entrée 2, tableau 4). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce manque de reproductibilité :

- Celui-ci ne viendrait pas de la réaction de phosphatation mais de l'analyse RMN. Comme il l'a été indiqué dans la partie analyse, en raison des problèmes de solubilité rencontrés avec, notamment, la formation d'une solution non homogène présentant des agrégats partiellement solubilisés qui décantent dans le temps, la quantification de façon certaine des phosphates n'a pu être réalisée. Ces problèmes de solubilité sont à mettre en relation directe avec les phénomènes de réticulation par des ponts phosphates. Il est difficile de savoir ce qui est réellement observé en RMN.
- Un autre facteur semblant intéressant pour expliquer ce manque de reproductibilité est l'ensemble des réactions secondaires qui peuvent être envisagées autour de la réaction de phosphatation [31]. Ces réactions sont représentées ci-dessous (figure 12). La production de carbamate de

l'EPS HYD 657, de carbamate phosphate de l'EPS et de phosphate d'ammonium et d'ammoniaque accompagnent très probablement la réaction de phosphatation. Lorsque ces réactions ont lieu, il y a également moins de réactifs disponibles pour la réaction de phosphatation.

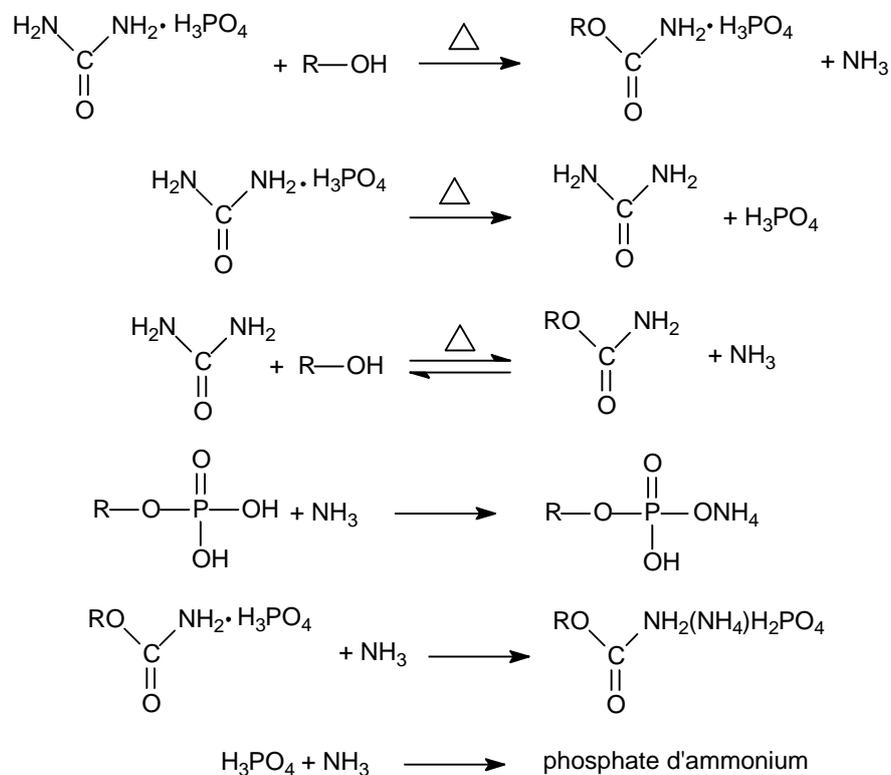


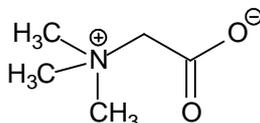
Figure 12 : Réactions secondaires possibles pendant la réaction de phosphatation en présence d'urée et d'acide phosphorique [31]

Une autre manipulation a été réalisée en doublant le temps de réaction. L'échantillon obtenu est totalement soluble. La solubilité est probablement due à des phénomènes d'hydrolyse acide favorisés dans nos conditions par l'allongement de la durée de la réaction. Dans ces conditions, les liaisons phosphomonoesters sont majoritaires à 90% (entrée 3, tableau 4). Les échantillons obtenus étant solubles, la M_w en HPSEC a donc pu être déterminée. Celle-ci est d'environ 80 000 g/mol pour un I_p de 2,75 mettant en évidence la dépolymérisation de l'échantillon natif.

En raison des problèmes de reproductibilités, de caractérisations rencontrés, de la complexité de du polysaccharide HYD 657 et de la complexité des réactions, semble-t-il, mises en jeu, la réaction ne nous a pas semblé exploitable directement sur le polysaccharide HYD 657. L'optimisation de la réaction n'a donc pas été poursuivie. La fixation de groupements phosphates et la formation des carbamates doivent pouvoir pourtant être ajustées en jouant sur les ratios molaires des différents réactifs, ainsi que la température et la durée de la réaction. Des études de phosphatation réalisées sur un polysaccharide moins complexe devraient permettre de mieux appréhender les phénomènes mis en jeu.

3- Ajout de groupements chargés positivement

De l'industrie du papier aux applications biomédicales, la chimie des polysaccharides cationiques fournit un éventail de produits qui sont maintenant devenus essentiels dans notre quotidien. Les polysaccharides cationiques peuvent être préparés par réaction du polymère natif avec de nombreux réactifs possédant des groupements chargés positivement tels que les groupements amino, imino, ammonium, sulfonium ou phosphonium [32]. La fixation de groupements bêtaïnes a plus particulièrement fait l'objet de cette étude. La glycine bêtaïne avait déjà fait l'objet d'études au laboratoire Synthèses et Activations de Biomolécules [33]. Ce substrat figure parmi les rares sources d'ammoniums quaternaires naturels. La glycine bêtaïne (représentée ci-dessous) ou *N,N,N*-triméthylglycine est un produit zwitterionique très stable, de faible poids molaire et abondant. Ainsi la bêtaïne tire son nom de la betterave à sucre dont elle est l'un des principaux constituants azotés (0,15 à 0,25% de la masse totale et 3 à 8% dans les mélasses).



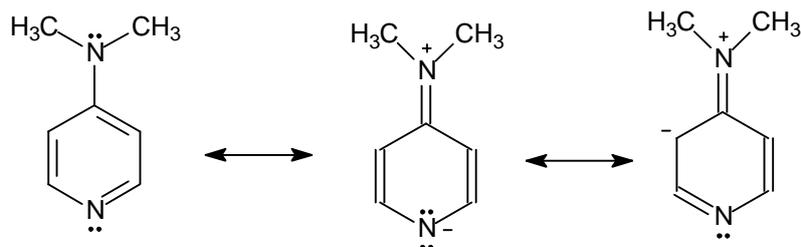
La glycine bêtaïne trouve également, entre autre, des applications dans des formulations cosmétiques [34,35].

Bien que l'EPS HYD 657 soit plus complexe que les polysaccharides fonctionnalisés précédemment par ce groupement, nous nous sommes intéressés à la faisabilité de la fixation de groupements bêtaïnes par des voies semblant déjà optimisées dans la littérature pour l'amidon [36]. Les nouveaux composés de la famille des bêtaïnes de polysaccharide qui pourraient être obtenus seraient susceptibles d'être exploités dans les domaines cosmétiques ou dermatologiques.

a) Réaction envisagée

L'ajout de groupement cationique a été réalisé sur l'EPS natif ou dépolymérisé par les ultrasons (échantillon de Grenoble de $M_w \approx 300\,000$ g/mol) et mis en solution dans le DMF sous forme de sels de pyridinium.

Le protocole utilisé est celui proposé par Auzély-Velty *et al* [36] pour l'ajout de groupement cationique à l'amidon en une étape. Cette approche directe est basée sur l'utilisation d'hydrochlorure de bêtaïne comme substrat de départ activé par deux catalyseurs, la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (figure 13). La DCC permet de convertir les acides carboxyliques de l'hydrochlorure de bêtaïne en agents acylants réactifs. Le groupe acyle est fortement réactif dans cet environnement du fait que la rupture de la liaison entre le carbone $C=O$ et l'oxygène $O-C=N$ convertit la liaison double carbone-azote de l'isourée en un groupe carbonyle plus stable. La DMAP est, quant à elle, un catalyseur d'acylation plus efficace que la pyridine : la fonction diméthylamino joue le rôle de substituant donneur d'électrons, ce qui exalte à la fois la nucléophilie et la basicité de l'azote de la pyridine :



La combinaison de l'activation du carboxyle de l'hydrochlorure de bétaïne par le DCC et de la catalyse par la DMAP représente une méthode de choix d'activation in situ des acides carboxyliques pour réaction avec les hydroxyles des polysaccharides. La réaction est ainsi menée dans des conditions douces : une nuit sous agitation à température ambiante.

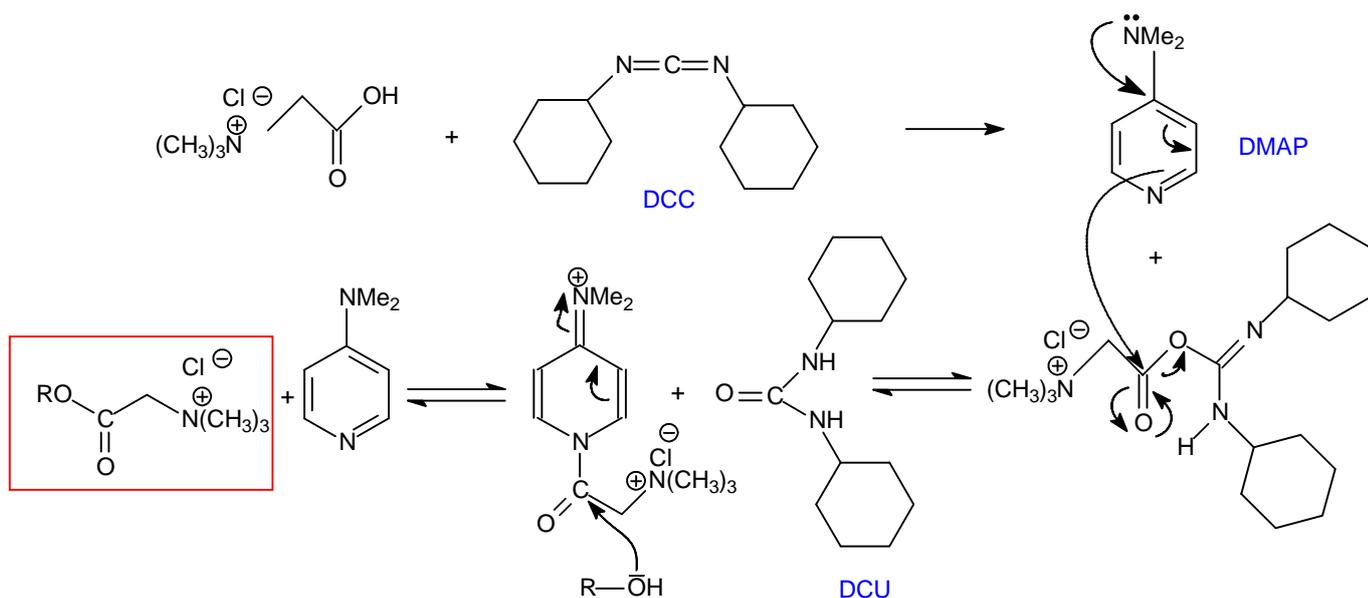


Figure 13 : Mécanisme d'ajout d'un groupement cationique bétaïne sur un hydroxyle

b) Analyses

- Analyses infrarouges (IR)

En comparant les spectres avant et après ajout du groupement cationique (figure 14), on observe, entre autre, l'apparition d'une bande caractéristique de l'estérification à 1756 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation des C=O des bétaïnes. Cette bande se distingue de celle obtenue pour l'hydrochlorure de bétaïne à 1730 cm^{-1} qui n'a pas été observée sur les spectres IR réalisés.

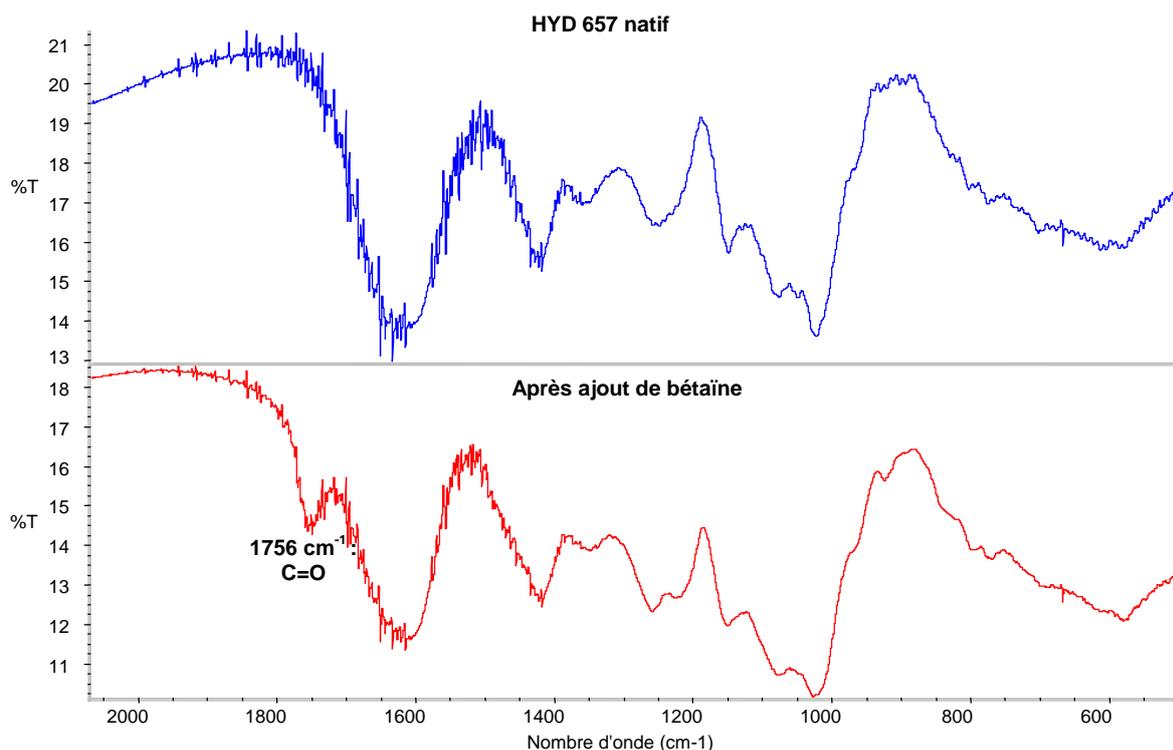


Figure 14 : Comparaison des spectres infrarouges obtenus avant et après ajout du bétainate

- **RMN ¹H**

Les études RMN ¹H [36] réalisées sur des bétainates d'amidon ont mis en évidence des déplacements caractéristiques pour les groupements bétainates, respectivement à 4,3 ppm pour les CH₂ et un singulet à 3,22 ppm pour les CH₃. Le squelette de l'amidon est, quant a lui, constitué de 3 pics larges situés entre 3,4 et 4 ppm.

La structure de l'EPS HYD 657 est plus complexe que celle de l'amidon. Ainsi, les signaux des protons du squelette se trouvent dans une région beaucoup plus étendue, entre 3 et 6 ppm. Si le signal correspondant au CH₃ des groupements bétainates est plus accessible que celui des CH₂ car plus intense, il est tout de même superposé aux signaux des squelettes. La déconvolution des spectres RMN dans la région 3-6 ppm peut permettre d'isoler l'intégration des CH₃ des bétainates par rapport aux intégrations des pics correspondant au squelette polysaccharidique et également du pic d'eau à 4,7 ppm. La quantification de l'ajout de groupements bétainates doit pouvoir ensuite être réalisée en intégrant le pic des CH₃ des rhamnoses, des fucoses et lactates à environ 1,2 ppm.

- **RMN ¹³C CP-MAS et SPE-MAS**

La technique d'acquisition en CP-MAS permet de combiner la polarisation croisée, le découplage dipolaire et la rotation à l'angle magique augmentant ainsi la sensibilité et la résolution du signal obtenu en RMN ¹³C.

Les spectres enregistrés en détection directe par SPE-MAS sur des échantillons hydratés permettent de détecter les chaînes de polymère de haute mobilité.

c) Résultats et discussions

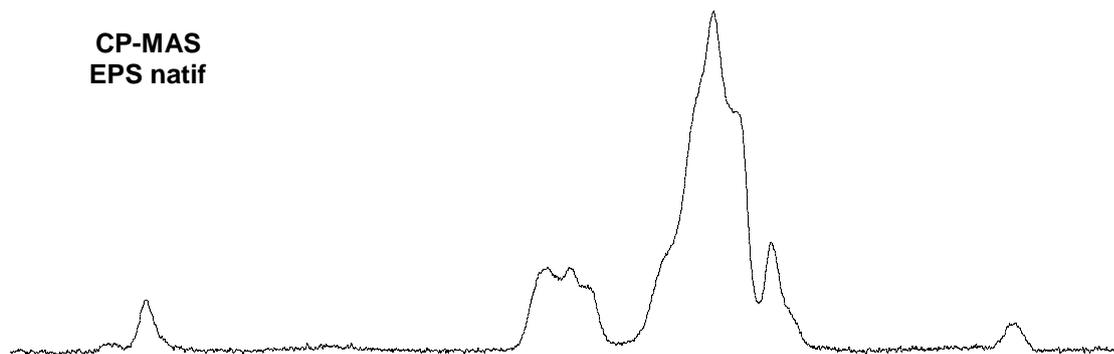
Lorsque, après lyophilisation, l'EPS fonctionnalisé par des bétaines a été mis en solution à température ambiante pour effectuer des analyses RMN ^1H , une partie de l'échantillon est restée insoluble. Ce problème d'homogénéité de l'échantillon peut avoir plusieurs sources parmi lesquelles :

- une inhomogénéité de la fonctionnalisation ;
- l'existence d'un seuil à partir duquel la molécule serait trop polaire ;
- l'existence de réactions inter- et/ou intra- moléculaires des carboxylates entraînant des structurations potentielles ;
- la possibilité que les bétaines se placent en contre-ion des carboxylates.

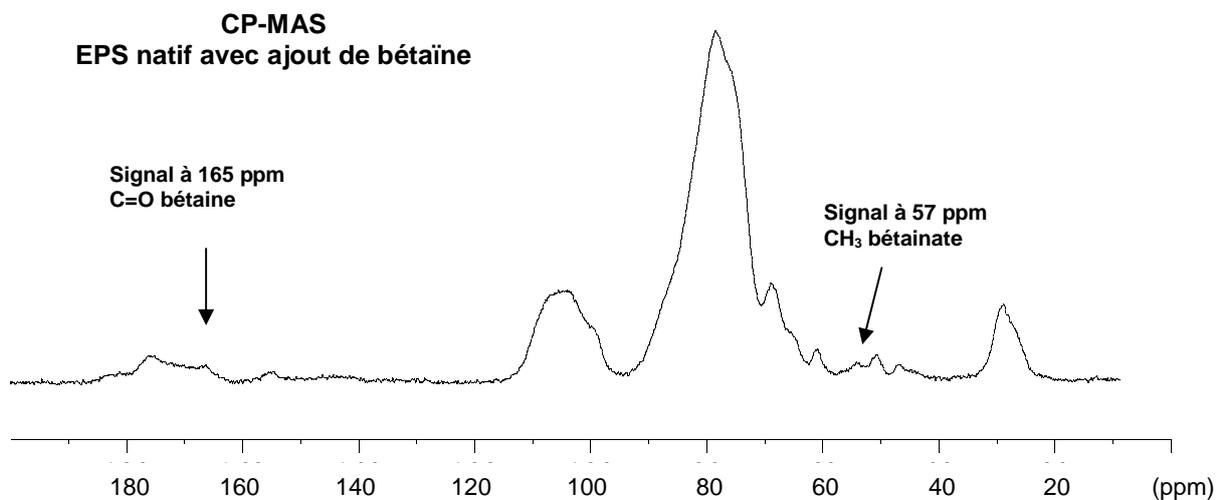
Pour les tubes partiellement solubles réalisés, le pic des bétaines à 3,2 ppm est bien observable. Par contre, dans ces conditions, une quantification fiable par RMN du proton des bétaines n'a pas semblé envisageable.

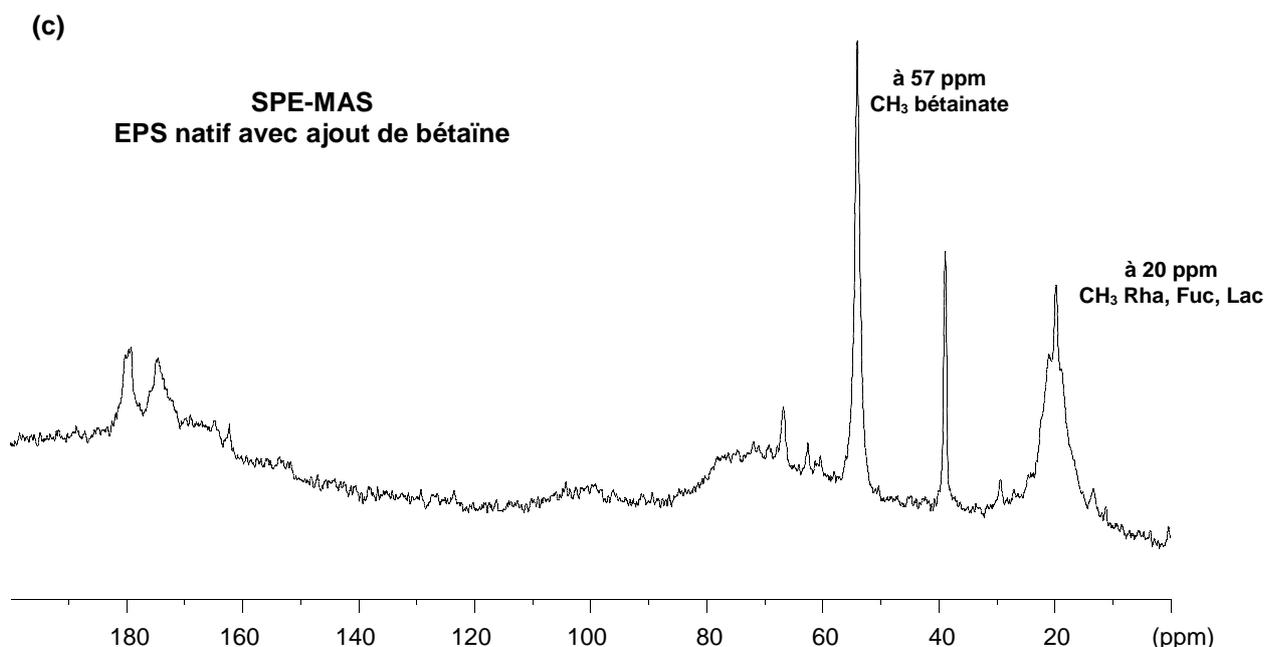
Nous nous sommes donc tournés vers des analyses de RMN du solide et SPE-MAS afin de mieux caractériser les échantillons (figures 15).

(a)



(b)





Figures 15 : Spectres CP-MAS (a et b) et SPE-MAS (c) de l'EPS natif et après ajout d'un groupement bétaïne

Le spectre CP-MAS de l'EPS natif après ajout d'un groupement bétaïne montre une modification de la zone 160-185 ppm avec l'apparition d'un signal à 165 ppm caractéristique du groupement C=O de la bétaïne et à 57 ppm caractéristique des CH₃ des bétaïnes. Le spectre SPE-MAS mettant en avant la mobilité des chaînes montre un signal particulièrement intense pour les CH₃ des bétaïnes. Une augmentation du pic correspondant aux CH₃ des rhamnoses, fucoses et lactates a également été observée aux environs de 20 ppm qui pourrait correspondre à une fixation préférentielle des bétaïnes sur ces unités.

Les analyses IR et RMN ont permis de confirmer la présence de groupements bétaïnes sur l'EPS HYD 657 modifié mais nous n'avons pas été en mesure de quantifier ceux-ci.

4- Augmentation de la lipophilie de l'ESP par estérification

La préparation de composés dans lesquels une substance biologique active non macromoléculaire serait liée au polymère par une liaison chimique peu stable dans l'environnement biologique fait l'objet de nombreuses recherches, notamment dans le domaine des cosmétiques [37,38].

De plus, l'estérification partielle ou totale des hydroxyles primaires peut conduire à des modifications intéressantes des propriétés physico-chimiques du polysaccharide (changement de viscosité, de solubilité dans les solvants, réticulation...) permettant d'élargir également les applications visées.

4.1- Acétylation

Dans un premier temps, l'ajout de groupements courts, les acétyles, a été envisagé en vue d'augmenter l'hydrophobicité de l'EPS HYD 657. Il s'agit de réactions classiques qui mènent à des produits assez facilement caractérisables.

L'acétylation d'un polysaccharide peut changer considérablement ses propriétés physiques. Par exemple, le gellane est un polymère linéaire de 500 kDa composé d'une unité répétitive de quatre monomères avec des groupements O-acétyle et glycéryl, il possède une conformation en double hélice. Des études ont montré que les groupements acétyles se trouvaient à l'extérieur de cette double hélice. Ainsi les groupements acétyles empêchent l'agrégation de doubles hélices et les phénomènes de gélation [39]. Pour les chitines, le taux d'acétylation permet, entre autre, de contrôler la solubilité du polysaccharide mais également sa capacité d'adsorption de métaux comme le cuivre (Cu^{2+}) [40].

Des polysaccharides acétylés font déjà l'objet d'applications en cosmétique [41].

a) Réaction d'acétylation

L'EPS HYD 657, sous sa forme native et dépolymérisée, a été acétylé en présence de pyridine et d'anhydride acétique dans les conditions de Na et al [42], soit à 45°C pendant 48h (Figure 16). L'acétylation est réalisée de façon sélective sur les fonctions alcools.

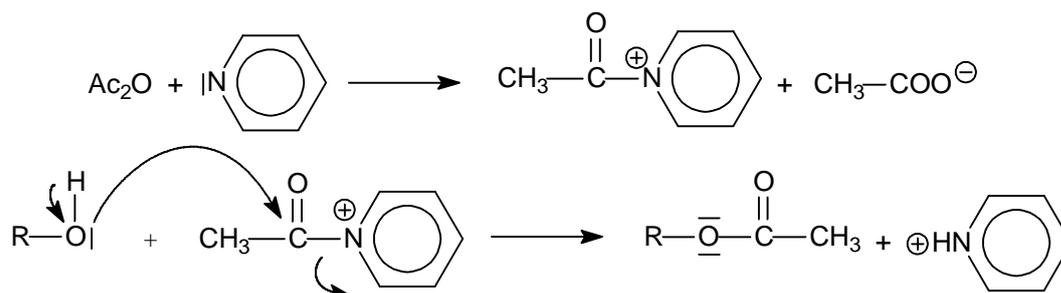


Figure 16 : Mécanisme d'acétylation pyridinique

b) Analyses

- Analyses infrarouges (IR)

L'introduction d'un groupement acétate se caractérise par l'apparition de 3 bandes (figure 17): la vibration d'élongation des C=O à 1750 cm^{-1} , la vibration de déformation des CH₃ à 1375 cm^{-1} et la vibration des O-C=O à 604 cm^{-1} .

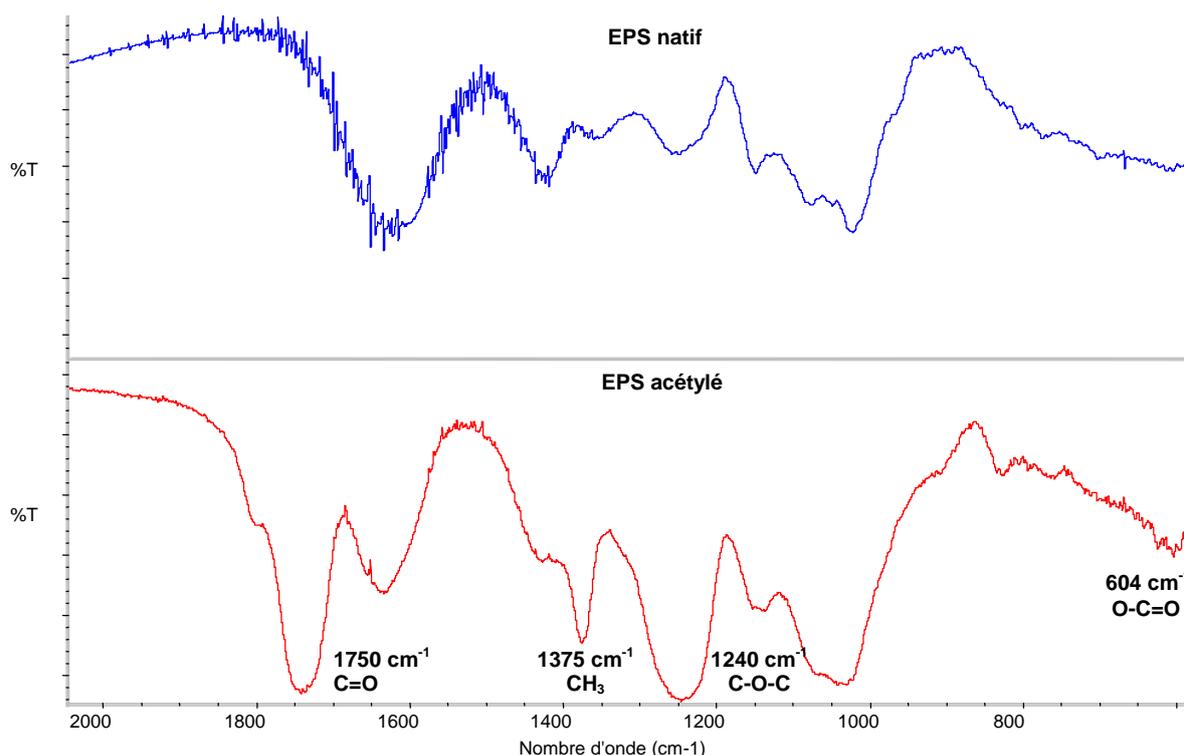


Figure 17 : Comparaison des spectres IR d'un échantillon d'EPS natif obtenu avant et après acétylation

- RMN ¹H

L'ajout de groupements acétates se caractérise par l'apparition d'un nouveau pic entre 1,6 et 2,4 ppm correspondant aux CH₃ des acétates (figure 18). L'ajout de groupements acétates se traduit également par une diminution des protons du squelette et donc une diminution de leur intégration.

La RMN ¹H permet de quantifier l'ajout de groupements acétates et d'estimer le degré d'acétylation (DA). Le DA se définit comme le nombre moyen de sites acétylés par unité répétitive. Pour l'EPS HYD 657, le degré d'acétylation maximum, calculé à partir de l'hypothèse de structure, est de 2,5. Nous avons souhaité vérifier la validité des résultats proposés en croisant plusieurs voies de calculs :

- La voie la plus simple consiste à intégrer les groupements acétates par rapport aux CH₃ des groupements fucoses, rhamnoses et lactates. Dans l'hypothèse de structure proposée, il y a donc 4 groupements CH₃ correspondant aux rhamnoses, aux fucoses et lactates par unité répétitive et 27 hydroxyles pouvant être acétylés.

$$\text{D'où : nombre de groupements acétylés} = \frac{4 \times A_{\text{acétylés}}}{A_{\text{Rha Fuc Lac}}} \quad \text{où } A \text{ désigne l'intégration en RMN } ^1\text{H}$$

- La quantification peut également être réalisée en intégrant les acétylés par rapport aux protons du squelette. Dans l'hypothèse de structure proposée, 90 protons appartenant au squelette par unité répétitive sont dénombrés. En appelant y le nombre de fonctions acétylées, nous obtenons :

$$\frac{A_{\text{squelette}}}{A_{\text{acétylés}}} = \frac{90 - y}{3y}, \quad \text{le pourcentage de fonctions acétylées et le DA en sont déduits.}$$

Dans un premier temps, l'intégration du squelette a été réalisée directement sur des spectres dans lesquels le pic d'eau a été supprimé sélectivement par irradiation continue de celui-ci.

Nous nous sommes ensuite interrogés sur le bien fondé de cette technique puisque le signal RMN relatif au squelette polysaccharidique de l'EPS HYD 657 se trouve également sous le pic d'eau. L'ensemble des spectres a été de nouveau analysé en RMN sans irradier le pic d'eau. La déconvolution des spectres réalisée dans la partie correspondant au squelette polysaccharidique avec le logiciel WinNMR (Bruker) a permis de dissocier la contribution du pic d'eau du reste du massif.

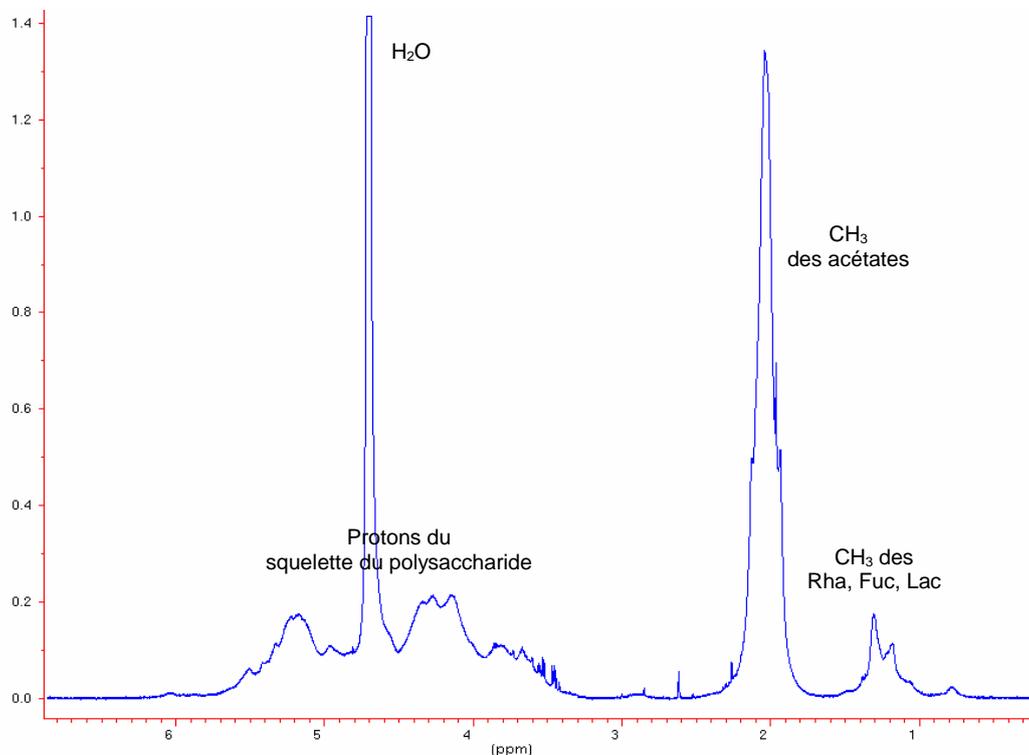


Figure 18 : Spectre RMN ^1H de l'EPS natif acétylé réalisé dans D_2O à 40°C

- **RMN ^{13}C CP-MAS**

L'ajout de groupements acétates se caractérise sur les spectres ^{13}C réalisés en CPMAS par l'apparition d'un signal intense à 20,8 ppm attribué aux méthyles des groupements acétylés (figure 19). L'ajout de groupements acétates se traduit également par un shift vers les hauts champs à 172 ppm du pic caractéristique des groupements $\text{C}=\text{O}$. Le massif des carbones C1 situé entre 90 et 110 ppm apparaît également affecté par l'acétylation. En effet, il est moins étalé et centré à 100 ppm qui constitue le déplacement chimique caractéristique des acides galacturoniques. Le pic des carbones C6, non carboxylés, apparaissant à 62,8 ppm a quasiment disparu, la majeure partie des hydroxyles primaires doit être estérifiée.

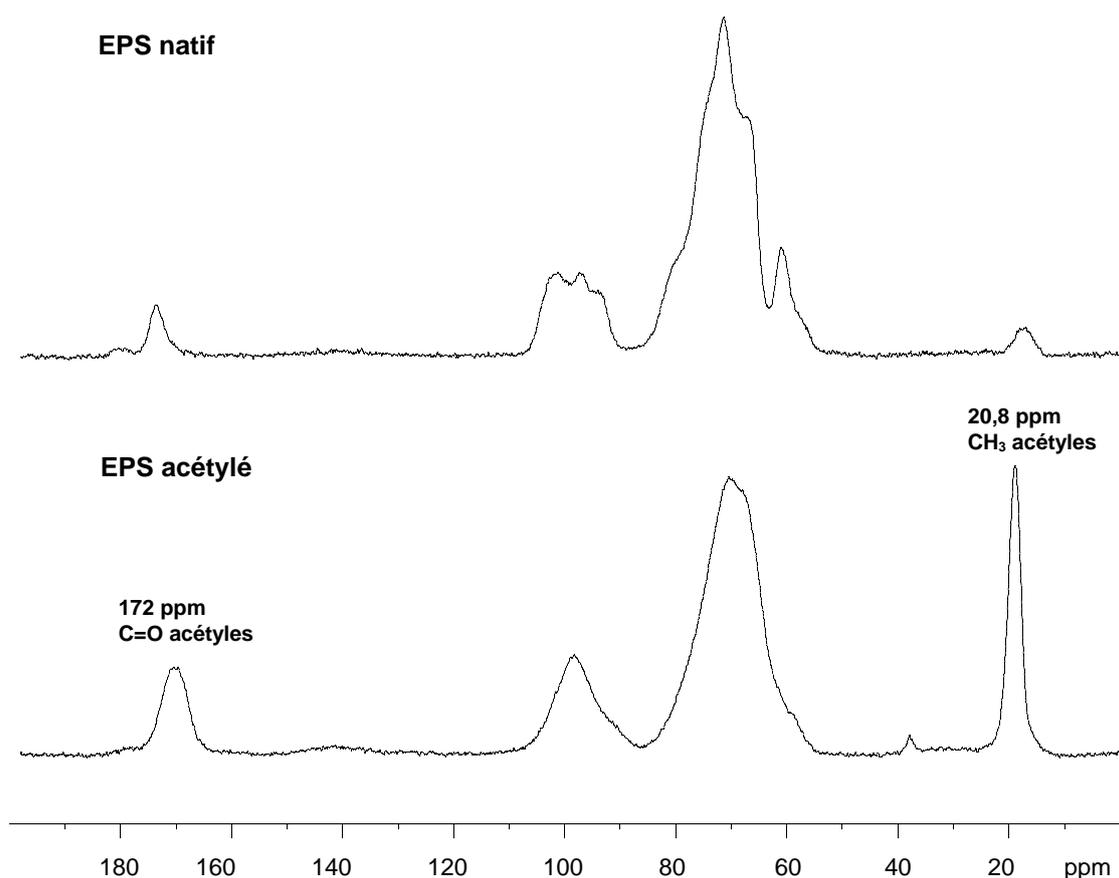


Figure 19 : Spectres CPMAS des échantillons natifs et acétylés

- **Détermination des masses molaires**

La masse molaire déterminée en HPSEC et exprimée en équivalents pullulanes permet d'estimer d'éventuelles modifications de la masse sur les chaînes polysaccharidiques.

c) Résultats et discussions

- **Résultats obtenus pour l'acétylation d'échantillons de différentes masses molaires**

A des échantillons natifs et dépolymérisés par ultrasons (M_w de 300 000 g/mol obtenus à Grenoble) et par catalyse métallique (M_w de 40 000 g/mol obtenue en présence de cuivre) sous forme de sels de pyridinium mis en solution dans une solution DMF-Pyr (97:3) ont été ajoutés une vingtaine d'équivalents molaires en anhydride acétique. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 5.

EPS	DA ^a			M_w (g/mol) ^b	Rendement (%) ^c
	Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3		
HYD 657 CM $M_w \sim 40\ 000$ g/mol	2,5	2,2	2,1	23 300	50
HYD 657 US $M_w \sim 300\ 000$ g/mol	2,5	2,5	2	233 000	90
HYD 657 Natif $M_w \sim 3\ 000\ 000$ g/mol	1,1	0,8	1,1	> 1 000 000	100

Tableau 5 : Caractéristiques des dérivés acétylés obtenus à partir de l'EPS HYD 657 natif et dépolymérisé par catalyse métallique (CM) ou ultrasons (US) ^a déduit de la RMN par différentes méthodes de calculs **1)** intégration par rapport aux Rha, Fuc et Lac **2)** intégration par rapport au squelette avec irradiation du pic d'eau **3)** déconvolution ; ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ

Les résultats obtenus montrent que l'acétylation serait (quasi)totale dans le cas des échantillons dépolymérisés et seulement partielle pour l'échantillon natif. Les rendements observés sont très bons dans le cas des échantillons de hautes masses molaires. La dépolymérisation au cours de la réaction d'acétylation semble faible par rapport à celle qui a été observée lors des réactions de sulfatation.

Les degrés d'acétylation obtenus par nos 3 méthodes de calculs sont proches pour les différents échantillons analysés. Cependant, une différence plus importante a été observée lors des calculs de DA de l'échantillon dépolymérisé par les ultrasons. Celle-ci peut s'expliquer par l'obtention de 2 pics superposés lors de la déconvolution du signal de l'eau. Le problème posé par la formation possible de nouvelles liaisons hydroxyles lors des phénomènes de dépolymérisation/dégradation qui pourraient fausser les calculs se référant à l'intégration du squelette polysaccharidique en augmentant le nombre de liaisons hydroxyles réellement présentes doit également être soulevé. Nous avons considéré que cet aspect pouvait être négligé sur ces échantillons qui sont relativement peu dépolymérisés.

De nouveaux essais ont été réalisés sur des échantillons natifs afin de réajuster les quantités d'anhydride acétique en vue d'obtenir une acétylation totale des hydroxyles (tableau 6). La quantité d'équivalents molaires en anhydride acétique a été multipliée par deux. Dans le cas des échantillons natifs, une augmentation de la quantité d'anhydride acétique permet d'améliorer le taux d'acétylation sans que celui-ci soit totale. Par contre, contrairement aux résultats obtenus lors de l'acétylation d'échantillons préalablement dépolymérisés sous ultrasons, une importante dépolymérisation est observée. Ainsi, après 48h de réaction et dans les mêmes conditions opératoires, les masses finales obtenues pour les échantillons que ceux-ci soient préalablement dépolymérisés ou pas, sont équivalentes.

EPS	Anhydride acétique (équiv)	DA ^a			M _w (g/mol) ^b	Rendement (%)
		Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3		
HYD 657 natif	20	1,1	0,8	1,1	> 1 000 000	100
	40	2,2	2,4	2,2	275 140	90

Tableau 6 : Evolution des caractéristiques de l'EPS natif lors de son acétylation par un nombre plus important d'équivalents en anhydride acétique ^a déduit par RMN 1) intégration par rapport aux Rha, Fuc et Lac 2) intégration par rapport au squelette avec irradiation du pic d'eau 3) déconvolution ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ

- Importance de la catalyse par la pyridine lors de l'acétylation

Dans l'objectif d'applications biologiques, l'importance de l'ajout de pyridine devait être vérifié. Nous nous sommes intéressés à son effet catalyseur dans le cadre de l'acétylation mais également à l'importance de la basicité apportée sur les phénomènes de dépolymérisation (tableau 7).

EPS	Pyridine	DA ^a			M _w (g/mol) ^b	Rendement (%)
		Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3		
HYD 657 US	0	1,7	1,5	2	202 500	80
	1 ml	2,2	2,4	2,2	233 000	100

Tableau 7 : Evolution des caractéristiques d'un échantillon dépolymérisé sous US lors de son acétylation en présence ou pas de pyridine ^a déduit de la RMN par différentes méthodes de calculs 1) intégration par rapport aux Rha, Fuc et Lac 2) intégration par rapport au squelette avec irradiation du pic d'eau 3) déconvolution ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ

En l'absence de pyridine pour catalyser la réaction, les échantillons obtenus sont moins acétylés. De plus, si la masse molaire finale obtenue, après 48h de réaction, ne diffère pas beaucoup, l'indice de polydispersité est, quant à lui, mauvais en l'absence de pyridine (4,4).

L'ajout de pyridine a donc été maintenu dans les études suivantes.

- Importance de la solubilité du polysaccharide lors de l'acétylation

Un essai a été réalisé avec l'EPS natif mis sous forme de sel de sodium, beaucoup moins soluble dans le DMF. L'acétylation a été réalisée en présence de pyridine et d'une quarantaine d'équivalents en anhydride acétique. L'acétylation de l'HYD 657 sous forme de sel de sodium forme un mélange peu homogène qui ne conduit qu'à une acétylation partielle.

L'importance de la solubilité, et donc de l'homogénéité du mélange, a également été mise en évidence lors de premières expériences réalisées avec des échantillons dépolymérisés par catalyse métallique qui n'avaient pas été mis sous forme de sels de pyridinium (tableau 8). Les échantillons même s'ils étaient de faibles masses molaires comparés aux échantillons natifs ou dépolymérisés par ultrasons, n'ont pas permis d'obtenir une bonne acétylation.

EPS	Sels	DA ^a			M _w (g/mol) ^b	Rendement (%)
		Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3		
HYD 657 CM	-	1,6	1,4	1	29 900	62
	Pyridinium	2,5	2,2	2,1	23 300	50

Tableau 8 : Caractéristiques d'un échantillon dépolymérisé par CM lors de son acétylation selon qu'il ait été mis préalablement ou pas sous forme de sels de pyridinium ^a déduit de la RMN par différentes méthodes de calculs **1)** intégration par rapport aux Rha, Fuc et Lac **2)** intégration par rapport au squelette avec irradiation du pic d'eau **3)** déconvolution ^b Mesure HPSEC en équivalent pullulane ^c calculé à partir de la masse d'EPS de départ

- Importance du solvant utilisé

Des manipulations ont été réalisées dans deux autres solvants pour des échantillons d'EPS mis sous forme de sels de pyridinium.

Le sulfolane ($\epsilon = 37$), a tout d'abord été envisagé comme substituant du DMF ($\epsilon = 43$). Les résultats se sont avérés décevants avec des problèmes rencontrés lors de la purification. Ainsi, l'échantillon obtenu, même après précipitation et lavages au méthanol, n'a pu être solubilisé pour être analysé en RMN.

Des manipulations ont été réalisées ensuite dans le DMSO devant permettre une amélioration des propriétés nucléophiles des oxygènes des groupements hydroxyyles de l'EPS. Ces manipulations ont conduit à des degrés d'acétylation inférieurs à 1.

- Cinétique d'acétylation de l'EPS HYD 657

Dans les expériences précédentes, des phénomènes de dépolymérisation accompagnant l'acétylation ont été mis en évidence. La durée de la réaction avait été fixée à 48h par rapport à la publication ayant servi de référence (Na) sur l'acétylation des pullulanes. Des cinétiques (figure 20) ont été réalisées dans les premières heures de l'acétylation d'EPS natif afin de voir si l'optimisation de la durée de la réaction pouvait permettre de limiter la dépolymérisation en gardant les mêmes degrés d'acétylation.

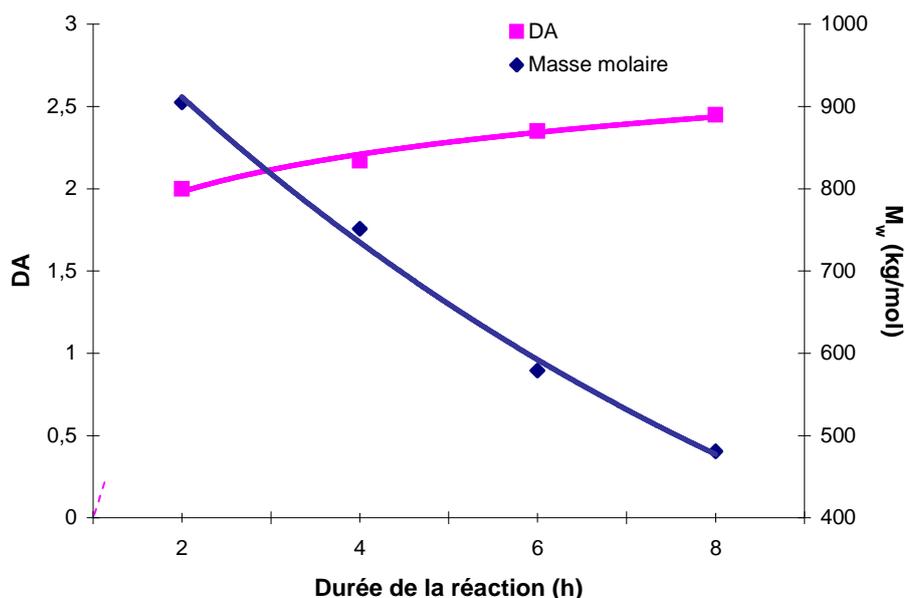


Figure 20 : Evolution du degré d'acétylation (DA) et de la M_w de l'EPS natif acétylé en fonction de la durée de la réaction

Le suivi cinétique de l'acétylation dans les 8 premières heures a permis de mettre en évidence qu'après seulement 2h de réaction le DA était déjà de 2 pour une dépolymérisation limitée puisque la M_w est alors encore supérieure à 900 000 g/mol. Après 8h, le DA maximum de 2,5 est atteint et l'allongement de la durée de la réaction ne conduit qu'à la dépolymérisation de l'échantillon (après 48h, $M_w \sim 275\ 000$ g/mol).

- Dépolymérisation d'échantillons acétylés

Des échantillons d'EPS HYD 657 natifs acétylés possédant une masse molaire supérieure à 1 000 000 g/mol ont ensuite été dépolymérisés par les deux voies traitées en détails précédemment : les ultrasons et la catalyse métallique.

L'échantillon acétylé dépolymérisé par catalyse métallique avec un ratio massique final en H_2O_2 de 0,2 après 2h possède une M_w finale d'environ 30 000 g/mol. Bien que l'ajout de groupements acétates limite les phénomènes de chélation du cuivre par les hydroxyles, la cinétique observée est identique à celle obtenue pour l'EPS natif. Le cuivre supplémentaire disponible pour réagir avec l'eau oxygénée a un rôle négligeable. Cette observation rejoint les résultats de l'étude menée sur la dépolymérisation en fonction de la quantité de cuivre dans la partie 2 de la thèse. A partir d'une certaine quantité de métal, un ajout supplémentaire n'apporte pas d'amélioration à la dépolymérisation. L'échantillon final est toujours bleuté même après ultrafiltration. Ces observations semblent indiquer une prépondérance de la chélation par les acides uroniques.

L'échantillon acétylé puis dépolymérisé sous ultrasons pendant 4h possède une M_w finale de 113 000 g/mol équivalente à celle qui avait été obtenue dans les mêmes conditions pour l'échantillon natif.

Un ordre préférentiel entre : l'acétylation puis la dépolymérisation ou la dépolymérisation suivie de l'acétylation n'a pu être mis en évidence.

La RMN 1H a permis d'estimer que l'acétylation était, dans nos conditions, et ceci de façon reproductible, (quasi)totale pour des échantillons dépolymérisés et partielle mais supérieure à 80%

des fonctions hydroxyles dans le cas des échantillons natifs de l'EPS HYD 657. L'importance de la réalisation de l'acétylation en phase homogène dans les conditions utilisées afin d'obtenir de bons DA a également été mise en évidence. Les échantillons acétylés sont faiblement dépolymérisés même après 48h de réaction par rapport aux résultats des réactions de sulfatation réalisées en l'absence de pyridine. La réalisation de cinétiques a permis d'optimiser le temps de réaction à 8h pour obtenir un DA maximum (2,5) avec une dépolymérisation/dégradation de l'échantillon réduite.

Les échantillons natifs acétylés peuvent par la suite être dépolymérisés par ultrasons ou par catalyse métallique de la même façon que les échantillons natifs.

4.2- Ajout de chaînes grasses

Nous nous sommes par la suite intéressés à la faisabilité de l'ajout de chaînes grasses sur la structure complexe de l'EPS HYD 657 en vue de lui conférer de nouvelles propriétés.

a) Réaction d'estérification

L'estérification par des chaînes grasses a été réalisée de façon classique en faisant réagir les hydroxyles de l'EPS, mis en solution dans le DMF sous forme de sels de pyridinium, avec des chlorures d'acide en présence de pyridine [43,44,45].

La présence de pyridine permet de catalyser la réaction d'estérification. Celle-ci est plus nucléophile qu'un alcool vis-à-vis de la fonction carbonyle d'un chlorure d'acide (figure 21). Aussi, l'ion acyl pyridinium est plus réactif vis-à-vis des fonctions hydroxyles que le chlorure d'acide original. La présence de pyridine permet également de neutraliser les protons générés pendant la réaction et permet d'éviter le développement de trop fortes concentrations en HCl pouvant entraîner la dépolymérisation de l'EPS.

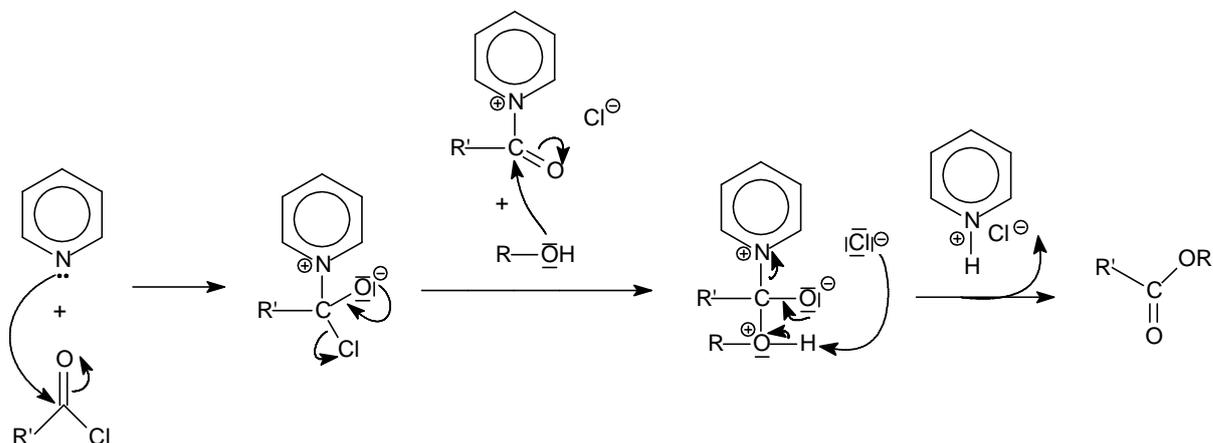


Figure 21 : Mécanisme d'estérification en présence de chlorure d'acyle et de pyridine

Des études ont également été réalisées en présence de DMAP comme catalyseur, celui-ci est moins nocif et plus efficace que la pyridine dont il dérive.

Le nombre d'équivalents en chlorure d'acyle a été déterminé par rapport aux manipulations précédentes d'acétylation et n'a pas fait l'objet d'optimisation. L'EPS natif et celui dépolymérisé sous ultrasons ont été estérifiés. Deux longueurs de chaînes ont été choisies pour exemple : le chlorure de décanoyle et le chlorure de stéaroyle.

b) Analyses

- Analyses infrarouges (IR)

La comparaison des spectres IR de l'EPS natif et de l'EPS après réaction doit permettre de confirmer s'il y a bien eu estérification. Dans un premier temps, le spectre obtenu après estérification par le chlorure de décanoyle a été étudié (figure 22). Dans la région $970-1200\text{ cm}^{-1}$, les 3 pics correspondants à la vibration d'élongation des C-O sont mieux résolus que pour le spectre de l'EPS natif. Dans la région $3000-3700\text{ cm}^{-1}$, une diminution, caractéristique de l'estérification, de la vibration d'élongation des hydroxyles est observée. Le maximum de ce pic est déplacé de 3390 cm^{-1} pour le pic de l'EPS natif à 3450 cm^{-1} pour l'EPS estérifié, ce qui s'explique par une diminution du nombre de protons hydroxyles du fait de l'estérification. Dans le produit final, une bande intense correspondant aux C=O des esters apparaît à 1750 cm^{-1} . Une bande plus importante est observée à $2800-2950\text{ cm}^{-1}$, correspondant à la vibration de déformation des méthylènes. Un nouveau pic apparaît également à 3022 cm^{-1} correspondant aux groupements méthyles des esters introduits.

Dans le spectre IR relatif à l'ajout de chlorure de stéaroyle, une diminution plus importante de la vibration des hydroxyles et une vibration plus grande pour les méthylènes ont été observées.

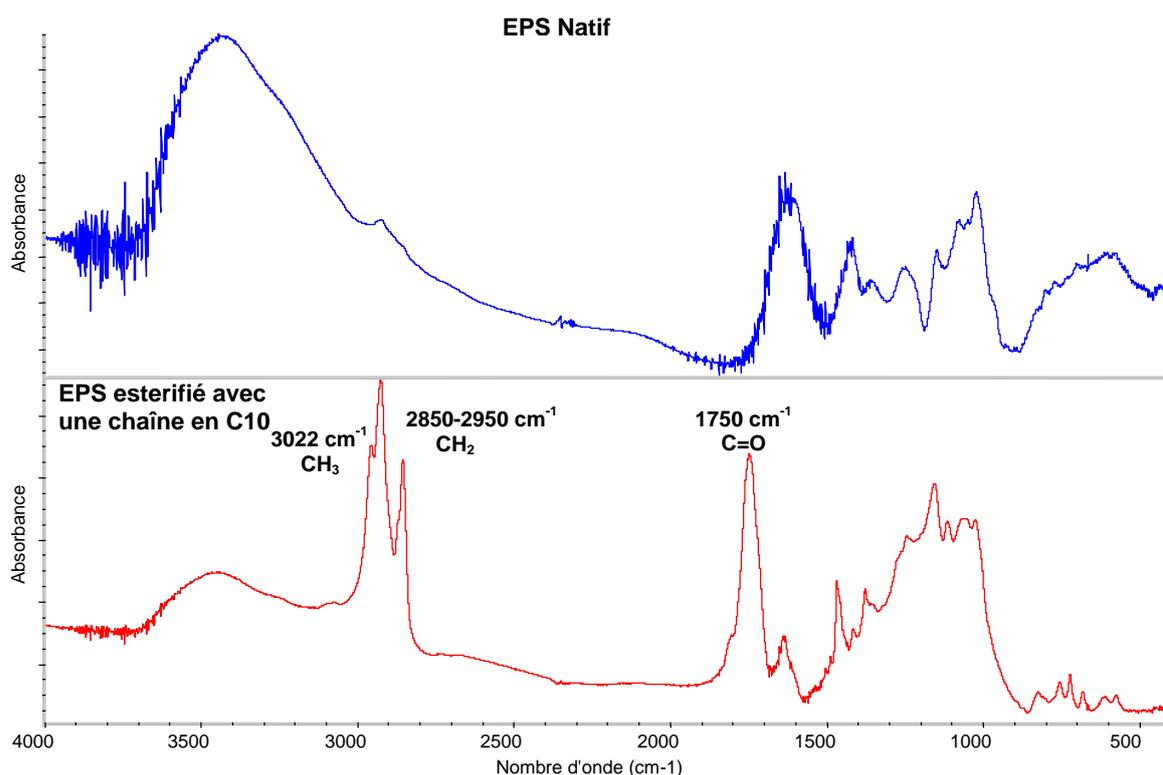


Figure 22 : Spectres IR de l'EPS avant et après estérification par le chlorure de décanoyle

- RMN ^1H

Les spectres en RMN du liquide ont été réalisés dans la pyridine- d_5 , seul solvant ayant permis de solubiliser totalement certains échantillon. En effet, des problèmes d'homogénéisation ont été observés pour les échantillons natifs solubilisés dans la pyridine. Ainsi, lorsque le tube RMN était au repos, la formation d'un dépôt sous forme de gel a été constatée. Par conséquent, seuls les produits obtenus à partir d'échantillons dépolymérisés sous ultrasons ont pu être analysés en RMN liquide.

L'ajout de groupements esters se caractérise par l'apparition de trois nouveaux massifs. Un massif à 0,85 ppm représentant le CH₃ terminal du groupement ester. Des pics entre 1,2 et 1,7 ppm correspondant aux CH₂ des esters. Un massif à 2,2 ppm correspondant aux CH₂ en α du C=O de l'ester.

L'ajout de groupements esters se traduit également par une diminution du nombre d'hydroxyles et donc une diminution de l'intégration des protons du squelette entre 3 et 6 ppm.

Les pics correspondant aux CH₃ des rhamnoses, des fucoses et des lactates se trouvent superposés avec ceux correspondants aux CH₂ des esters. La quantification ne peut donc pas être réalisée directement à partir de l'intégration du massif correspondant aux CH₃ des rhamnoses, des fucoses et des lactates. Ceci nécessite donc une déconvolution de cette partie du spectre.

D'autre part, la diminution du nombre d'hydroxyles rend difficile leur intégration. Il paraît quasiment impossible de les dissocier du pic d'eau par déconvolution.

Les problèmes rencontrés lors de précédentes modifications nous ont amené à nous demander si le produit dépolymérisé et estérifié était bien parfaitement soluble dans la pyridine-d₅. Nous avons souhaité nous assurer que la RMN liquide nous permettait de voir l'ensemble de l'échantillon et pas seulement la partie la plus soluble de celui-ci. Des spectres ont donc été réalisés en phase gel en HR-MAS en collaboration avec le laboratoire « RMN structurale des protéines et des interactions lipides-protéines » de l'UMR CNRS 6026 (Université de Rennes 1) sur un spectromètre RMN Avance 500 MHz (Bruker) équipé d'une sonde HR-MAS triple résonance. Cette technique de rotation à l'angle magique a pour but d'éliminer les contributions anisotropes intervenant dans les différentes interactions mesurées par RMN et qui induisent d'importants élargissements des raies. Les spectres obtenus sont mieux résolus (figure 23) et ont permis de dissocier plus facilement : l'intégration de l'eau par rapport à celle des protons du squelette par déconvolution (figure 24), et celle des rhamnoses, fucoses et lactates par rapport aux esters ajoutés.

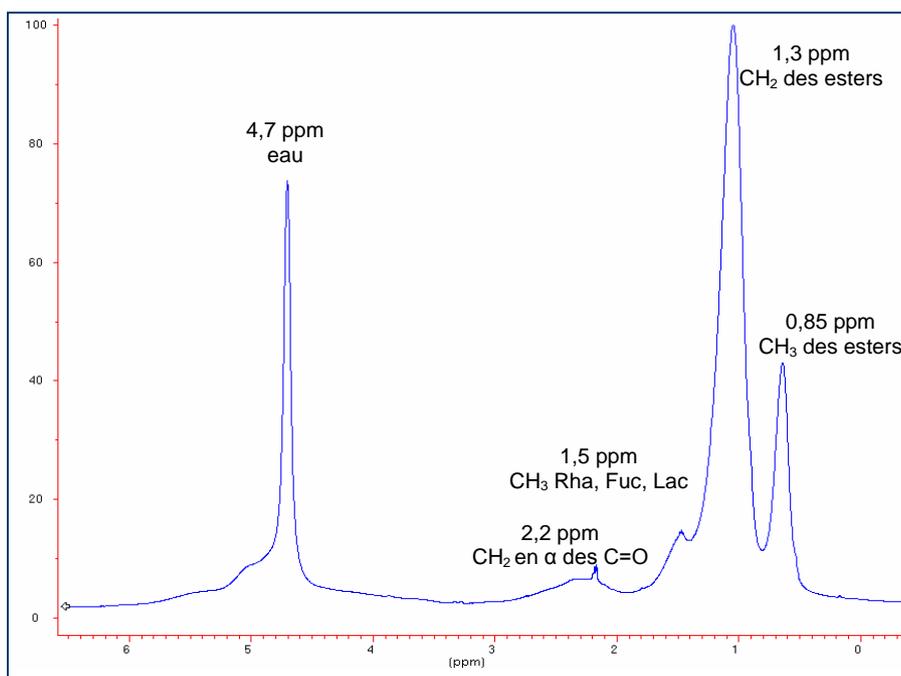


Figure 23 : Spectre HR-MAS du proton de l'EPS dépolymérisé sous ultrasons puis estérifié par le chlorure de décanoyle réalisé dans la pyridine-d₅ à 40°C.

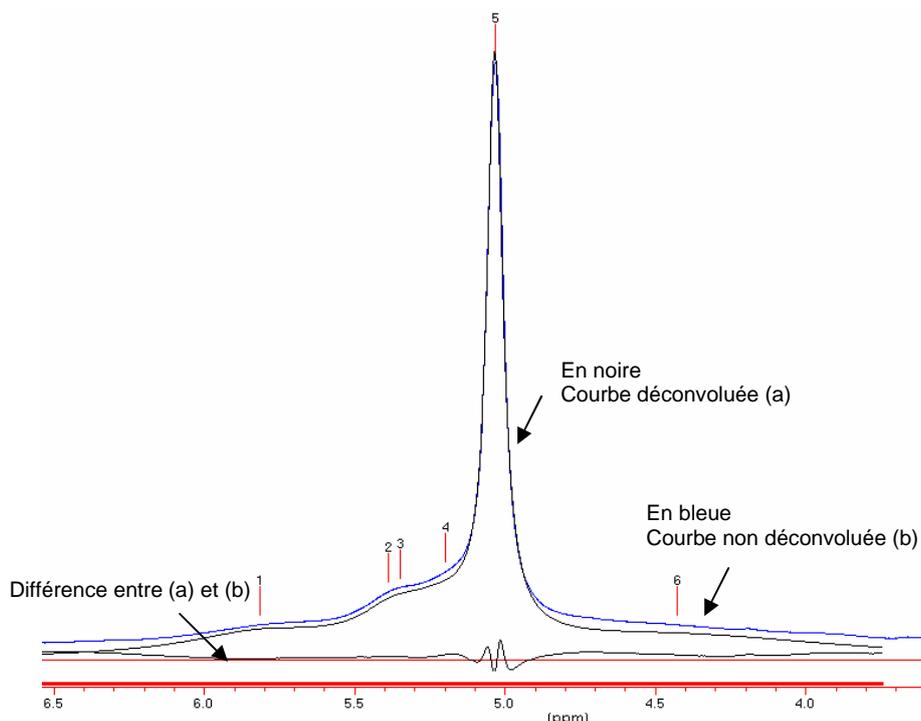


Figure 24 : Exemple de déconvolution réalisée sur la partie correspondant au squelette du polysaccharide. Les marques correspondent à des pics déconvolués

A partir de la déconvolution des deux parties du spectre, les différentes intégrations ont été calculées. Ainsi, pour le spectre présenté, l'eau intègre pour 15% dans la région 3,5-6 ppm.

Les déconvolutions des spectres HR-MAS ont permis d'évaluer l'estérification de deux façons :

- un calcul a été réalisé en prenant le rapport entre l'intégration du pic du squelette et celui des CH₂ en α qui n'a pas nécessité de déconvolution. De la même façon que pour l'acétylation, on peut écrire :

$$\frac{A_{\text{squelette}}}{A_{\text{CH}_2\text{en } \alpha}} = \frac{90 - y}{2y} \quad (1) \text{ où } A \text{ désigne l'intégration du pic en RMN } ^1\text{H et } y \text{ le nombre de groupements}$$

esters introduits

- le calcul peut également être réalisé avec le pic déconvolué des CH₃ des groupements esters :

$$\frac{A_{\text{squelette}}}{A_{\text{CH}_3}} = \frac{90 - y}{3y} \quad (2)$$

Le nombre de groupements esters introduits ainsi que le degré de substitution ont été déduits à partir de ces relations.

- RMN ¹³C CP-MAS et SPE-MAS

Les spectres ¹³C réalisés en CP-MAS sur un échantillon d'EPS natif estérifié avec du chlorure de décanoyle (figure 25) voient apparaître les signaux caractéristiques des carbones aliphatiques des chaînes grasses entre 10 et 50 ppm. Comme pour l'échantillon acétylé, le massif des carbones anomériques entre 90 et 110 ppm a été affecté par l'estérification et apparaît centré sur 100 ppm pour une largeur de massif moindre et le pic des carbones C6 non carboxylés apparaissant à 62,8 ppm diminue considérablement.

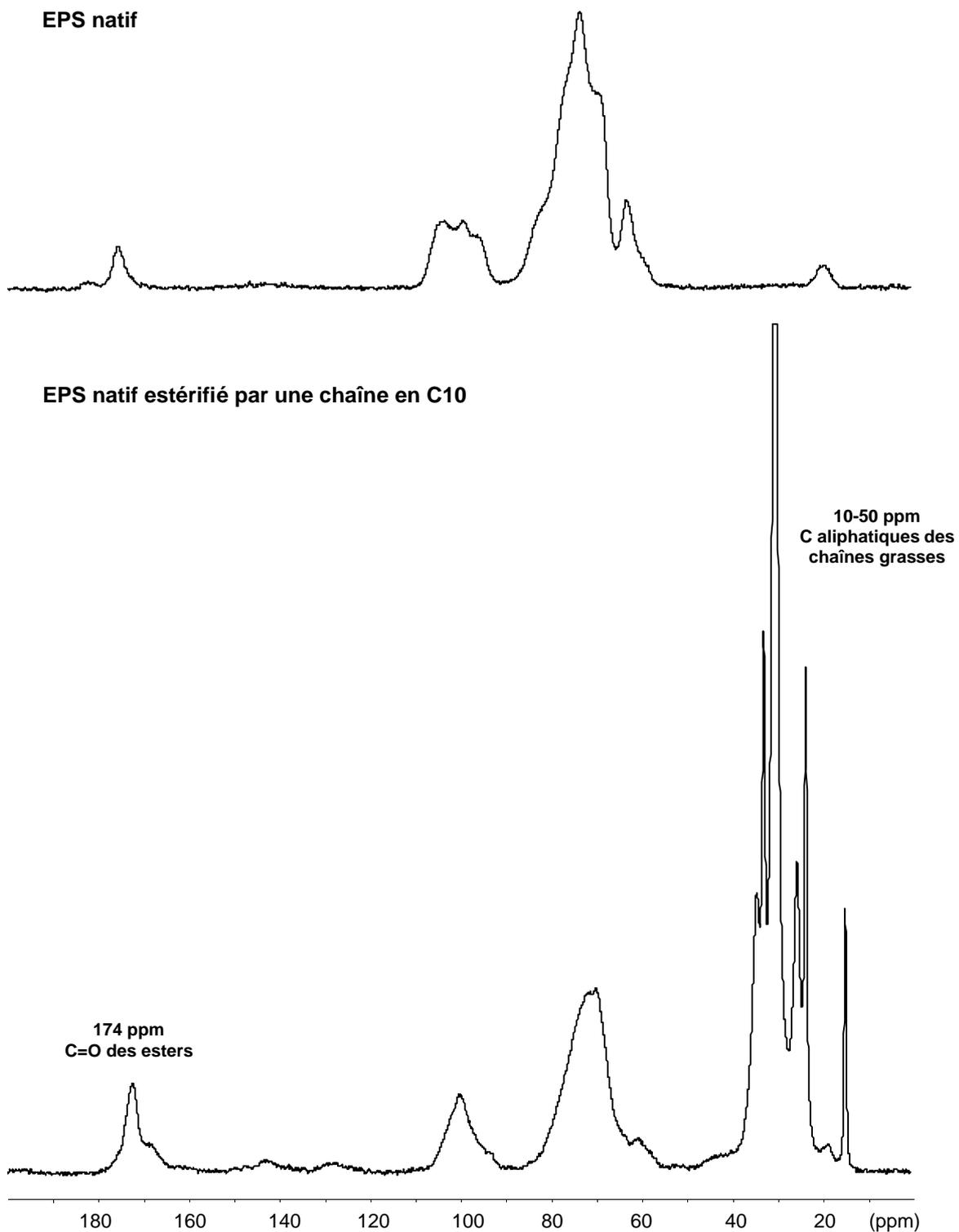


Figure 25 : Spectres CP-MAS des échantillons natifs et estérifiés par du chlorure de décanoyle

La disparition des signaux relatifs au polysaccharide sur les spectres réalisés en SPE-MAS (figure 26) a permis de mettre en évidence la rigidification de la chaîne qui accompagne l'estérification de l'EPS par une chaîne grasse. En effet, les enregistrements réalisés en CP-MAS augmentent les signaux des carbones fortement couplés à des protons via des interactions dipolaires, c'est à dire dans un environnement riche en protons et rigide [46].

EPS natif estérifié par une chaîne en C10

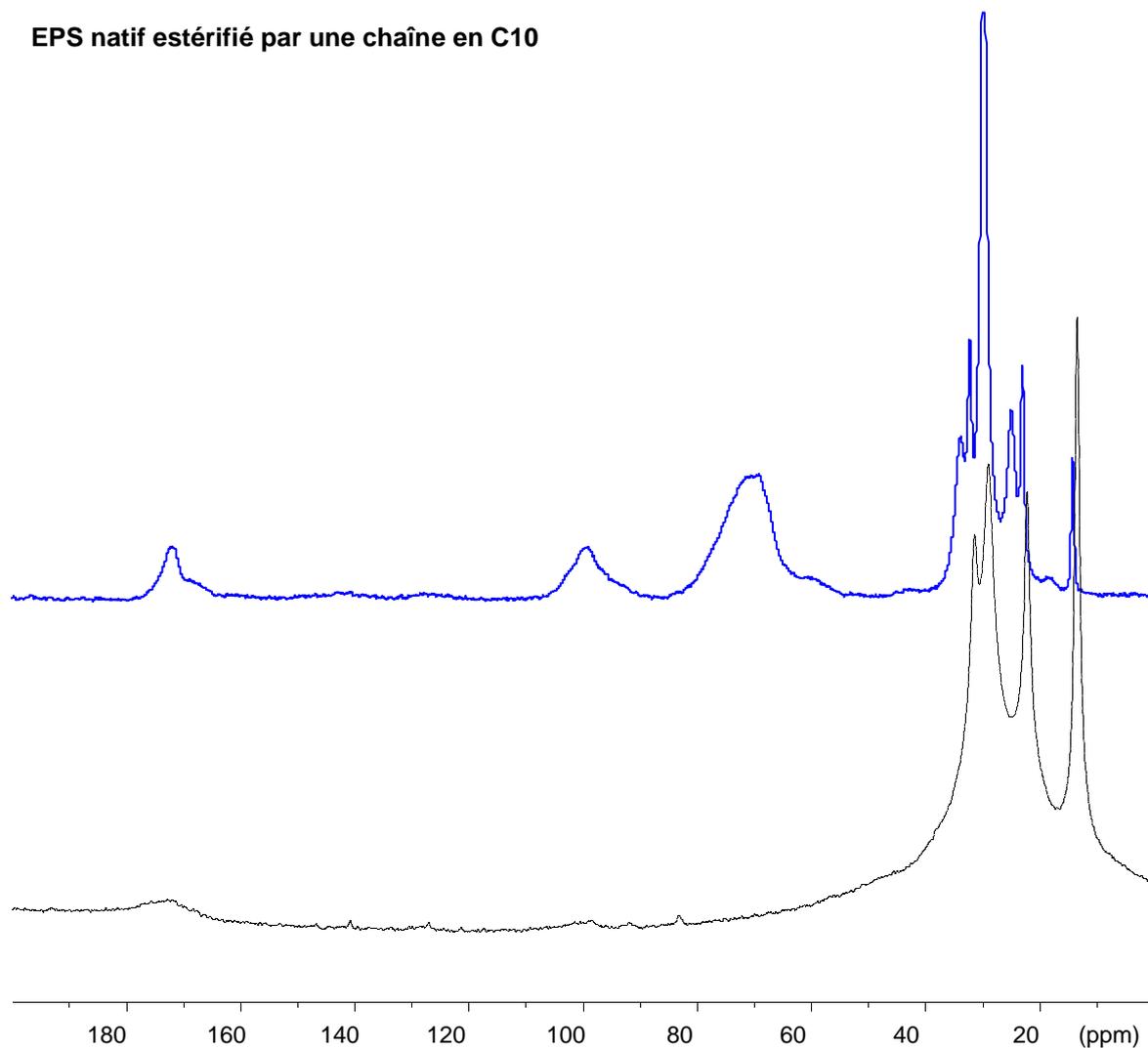


Figure 26 : Comparaison des spectres CP-MAS (bleu) et SPE-MAS (noir) d'un échantillon natif estérifié par du chlorure de décanoyle

- Analyses élémentaires

Des analyses élémentaires ont été réalisées sur les échantillons dépolymérisés sous ultrasons puis estérifiés par du chlorure de décanoyle ou de stearoyle ayant fait l'objet d'une étude HR-MAS afin de vérifier les degrés de substitutions obtenus en RMN. Des analyses élémentaires ont également été réalisées sur des échantillons natifs n'ayant pas pu être analysés par RMN afin d'évaluer leurs degrés de substitution.

L'hypothèse de structure a permis la détermination d'une formule moléculaire de l'EPS natif : $C_{69}H_{107}O_{57}$. Cette formule moléculaire a permis de déterminer les pourcentages théoriques obtenus en chacun des éléments en fonction du degré de substitution.

c) Résultats et discussions

Par rapport aux faibles degrés de substitutions rencontrés précédemment en acétylation lorsque l'EPS n'était pas initialement bien dissous, les expériences suivantes ont été menées en phase homogène dans le DMF avec l'EPS sous forme de sel de pyridinium.

Après estérification, l'introduction de longues chaînes hydrocarbonées entraîne une insolubilité des échantillons dans l'eau. L'augmentation de l'hydrophobie avec la longueur de la chaîne carbonée se traduit par une insolubilité totale des échantillons dans l'eau alors que les échantillons acétylés, après 48h de réaction, même lorsque l'acétylation est totale, restent solubles dans l'eau. La meilleure solubilité des échantillons estérifiés a été obtenue dans la pyridine : celle-ci est totale pour les échantillons qui avaient été préalablement dépolymérisés sous ultrasons et n'est que partielle pour les échantillons natifs.

Les estimations des degrés de substitution et la comparaison des résultats obtenus en RMN et en analyses élémentaires n'ont pu être réalisées que sur les échantillons estérifiés parfaitement solubles. Ainsi, pour le spectre HR-MAS présenté figure 24 correspondant à un échantillon dépolymérisé sous ultrasons puis estérifié par du chlorure de décanoyle, la relation (1) se basant sur le rapport des intégrations du squelette et des CH₂ en α du C=O conduit à un DS de 1,3 et la relation (2) se basant sur le rapport des intégrations du squelette et des CH₃ des groupements esters à un DS de 1,1. De même, l'étude HR-MAS d'un échantillon dépolymérisé sous ultrasons puis estérifié par du chlorure de stéaroyle conduit à un DS de 1,7 en se basant sur le rapport des intégrations du squelette et des CH₃ des groupements esters (relation 2).

Pour l'ajout de 18 groupements esters par unité répétitive, soit un degré de substitution de 1,6, la formule moléculaire théorique d'une unité répétitive restée sous forme de sels de pyridinium s'écrit C₂₆₄H₄₄₆O₇₅N₃. Les résultats théoriques des pourcentages des différents éléments obtenus pour ce degré de substitution vérifient nos résultats d'analyses élémentaires pour l'échantillon préalablement dépolymérisé sous ultrasons puis estérifié par du chlorure de décanoyle (tableau 9). Des calculs similaires conduisent à un degré de substitution de 1,4 pour les mêmes échantillons estérifiés par du chlorure de stéaroyle.

Les degrés de substitution estimés par les analyses élémentaires et les études HR-MAS ne diffèrent qu'à plus ou moins 3 groupements estérifiés par unité répétitive. Au vu des approximations réalisées, ces résultats peuvent être considérés comme satisfaisants.

EPS	Résultats théoriques			Analyses élémentaires			Formule moléculaire	DS
	%C	%H	%N	%C	%H	%N		
Dépolymérisé sous US puis estérifié par une chaîne en C10	65,23	9,18	0,86	65,35	9,15	0,79	C ₂₆₄ H ₄₄₆ O ₇₅ N ₃	1,6
Dépolymérisé sous US puis estérifié par une chaîne en C18	69,93	10,40	0,69	69,82	10,61	0,52	C ₃₅₄ H ₆₃₂ O ₇₂ N ₃	1,4

Tableau 9 : Détermination du degré de substitution (DS) par analyses élémentaires d'échantillons dépolymérisés sous ultrasons puis estérifiés

Les degrés de substitution estimés par les deux méthodes d'analyses sont supérieurs à 1. Ces résultats tendent à montrer que malgré le plus grand encombrement des hydroxyles secondaires, l'estérification n'est pas sélective vis-à-vis des hydroxyles primaires. Dans les conditions utilisées,

l'estérification demeure, cependant, partielle contrairement à ce qui avait été obtenu en acétylation pour les échantillons dépolymérisés sous ultrasons.

De plus, les rendements molaires obtenus sont d'environ 65%. Le rendement pourrait être amélioré en optimisant les quantités d'acyles introduites et en limitant ainsi les lavages nécessaires à la purification finale de l'EPS estérifié. Ce rendement molaire pourrait également correspondre à un seuil maximum d'estérification.

Le degré d'estérification ne semble pas influencé par la longueur de la chaîne, avec des DS estimés à 1,4 pour l'ajout d'une chaîne en C18 et 1,6 pour l'ajout d'une chaîne en C10 (tableau 9).

La comparaison des spectres IR de l'EPS natif estérifié par le chlorure de décanoyle en présence de pyridine ou de DMAP montre une diminution du pic relatif aux hydroxyles dans la région 3000-3700 cm^{-1} lors de l'ajout de DMAP. Cette diminution semble indiquer une meilleure réactivité en présence de DMAP qui doit être vérifiée.

Des analyses RMN sur les échantillons natifs n'ayant pu être réalisées pour des problèmes de solubilité, seules les analyses élémentaires ont permis d'évaluer le degré d'estérification de ces échantillons (tableau 10).

EPS	Résultats théoriques			Analyses élémentaires			Formule moléculaire	DS
	%C	%H	%N	%C	%H	%N		
Natif estérifié par une chaîne en C10 en présence de pyridine	62,25	8,59	1,07	62,10	8,72	0,87	$\text{C}_{204}\text{H}_{338}\text{O}_{69}\text{N}_3$	1,1
Natif estérifié par une chaîne en C10 en présence de DMAP	62,25	8,59	1,07	61,87	8,94	0,93	$\text{C}_{204}\text{H}_{338}\text{O}_{69}\text{N}_3$	1,1
Natif estérifié par une chaîne en C18 en présence de pyridine	70,41	10,50	0,66	70,71	10,73	0,63	$\text{C}_{372}\text{H}_{666}\text{O}_{73}\text{N}_3$	1,45

Tableau 10 : Détermination du degré de substitution (DS) par analyses élémentaires pour des échantillons natifs estérifiés dans différentes conditions

Les résultats des analyses élémentaires réalisées sur des échantillons natifs estérifiés ont montré des degrés d'estérification proches quelque soit le catalyseur utilisé. De plus, ces résultats ont permis de confirmer que la longueur de la chaîne grasse ajoutée ne semblait pas influencer le degré d'estérification de l'EPS.

Les résultats encourageants obtenus avec des DS supérieurs à 1, quelque soit la longueur de la chaîne, permettent d'envisager la fixation d'autres groupements bioactifs sur l'EPS HYD 657. Les produits partiellement estérifiés obtenus sont hydrophobes et présentent donc de nouvelles propriétés à exploiter. Un contrôle du degré d'estérification permettra de jouer sur la solubilité de l'EPS estérifié. Les rendements observés (environ 65%) doivent pouvoir être améliorés par une optimisation de la quantité de réactifs utilisés ce qui diminuerait le nombre de lavages nécessaires.

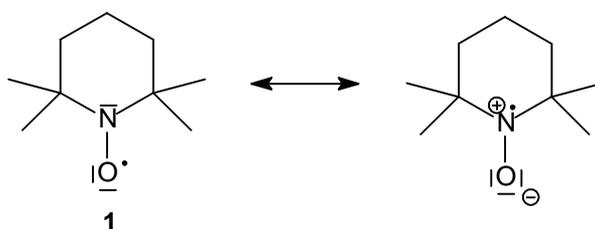
5- Variations structurales fortes : oxydation de l'EPS

Parmi les réactions de modifications chimiques des polysaccharides, l'oxydation des fonctions alcools contenues dans les carbohydrates a suscité beaucoup d'intérêt ces dernières années. D'une part, pour les caractéristiques intéressantes qu'apporte l'oxydation aux polysaccharides avec, par

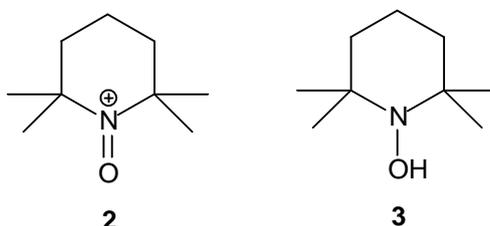
exemple, les propriétés gélifiantes ou d'agents complexants d'ions métalliques voire de super-absorbants avec des applications dans des domaines variés. D'autre part, pour la possibilité qu'ils offrent de poursuivre la modification sur le polysaccharide oxydé via entre autres des estérifications ou des amidations. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'oxydation sélective des alcools primaires permettant d'enrichir l'EPS HYD 657 en fonctions uroniques.

a) Réaction d'oxydation sélective

S'il existe un grand nombre de méthodes pour oxyder sélectivement un alcool secondaire en présence d'un alcool primaire relativement peu d'entre elles décrivent l'oxydation sélective des alcools primaires sans affecter les alcools secondaires. Ainsi, il y a plus d'un demi-siècle, des études [47] ont montré que NO_2 oxydait préférentiellement les alcools primaires des polysaccharides pour conduire à des acides uroniques. Plus récemment, une modification de ce protocole avec la génération in situ des oxydes d'azote a été décrite [48]. Cependant, même dans ces conditions, l'oxydation des alcools primaires s'accompagne d'une dégradation importante du polymère et de phénomènes d'oxydation non sélectifs nécessitant une étape de réduction. L'oxydation sélective par Pt/O_2 n'est possible que pour de plus petits substrats (monomères, oligomères). En effet, cette réaction appliquée aux polysaccharides est lente et conduit à un faible degré d'oxydation en raison du caractère hétérogène de la catalyse [49]. Il y a une vingtaine d'année les travaux de Semmelhack et al [50] ont proposé l'utilisation d'un radical organique nitroxy 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy (TEMPO, **1**) stable comme médiateur de la réaction. La distribution de 3 électrons π sur 2 centres atomiques, selon les formules mésomères présentées ci-dessous et son encombrement permettent d'expliquer la stabilité de ce radical :

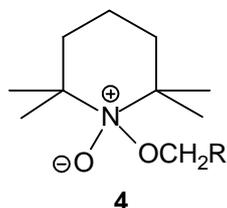


L'oxydant actif lors de la réaction est le cation nitrosonium **2** qui peut être synthétisé à partir du TEMPO. Pendant l'oxydation **2** est réduit en hydroxyle amine **3**.



Le radical **1** peut être utilisé en quantité catalytique comme médiateur de l'oxydation : celui-ci est oxydé in situ puis régénéré par un oxydant auxiliaire. Parmi les divers oxydants secondaires utilisés, le système radical TEMPO- hypochlorite de sodium- bromure de sodium est le plus étudié actuellement. L'intérêt de l'introduction du bromure de sodium s'explique par une plus grande réactivité de l'ion hypobromite par rapport à l'ion hypochlorite permettant ainsi la régénération rapide de l'ion oxammonium.

Les réactions mises en jeu lors de l'oxydation sont complexes et le mécanisme n'est pas encore totalement élucidé, notamment concernant l'étape d'oxydation de l'alcool par l'ion oxoammonium. La plupart des auteurs retiennent la formation d'un état de transition cyclique même si quelques uns [51,52] supportent l'idée de la formation d'un intermédiaire du type **4** pour l'étape limitante.



Un cycle réactionnel est proposé figure 27 [52,53].

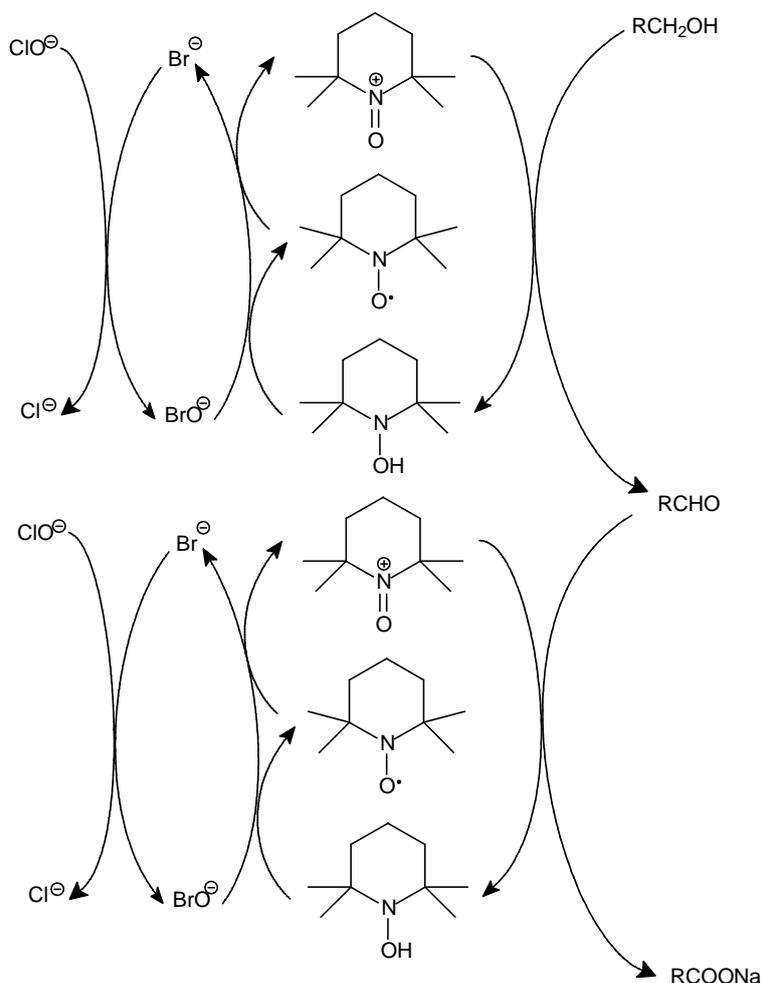


Figure 27 : Cycle catalytique pour l'oxydation des alcools primaires en acide carboxylique par le système TEMPO-NaOCl-NaBr

Les premières utilisations de ce système pour des polysaccharides solubles dans l'eau (amidon, amyloextrine, pullulanes) ont été apportées par de Nooy en 1995 [52].

Ce système a plus particulièrement été sélectionné car il possède de nombreux avantages par rapport à d'autres décrits par ailleurs :

- Le TEMPO étant soluble dans l'eau, un système réactionnel homogène est obtenu ;
- Pour les pyranosides, des sélectivités supérieures à 95% en l'absence de produits secondaires sont rapportées [52] ;

- La dépolymérisation est réduite, dans des conditions choisies.

Il s'agit donc d'une méthode de choix à condition que des précautions expérimentales soient prises. Ces conditions sont bien documentées dans la littérature récente et ont permis d'élaborer les premiers protocoles expérimentaux.

Conditions retenues à partir de l'étude bibliographique :

- **Température :**

La vitesse de la réaction d'oxydation est augmentée par une température plus importante. Cependant, la vitesse de réaction des oxydations non-sélectives des hypochlorites et des hypobromites augmente également avec la température [54]. L'oxydation doit donc être réalisée à basses températures 0-5°C.

- **pH :**

Les vitesses de réactions les plus rapides ont été reportées entre 10 et 11 pour les pullulanes [52]. Cependant, la dégradation la moins importante est observée pour des pH plus faibles car les hydroxydes peuvent conduire à la dégradation du polysaccharide pendant l'oxydation, probablement par β -élimination [55]. En effet, les groupements électrodonneurs comme les aldéhydes ou les cétones induisent des β -éliminations dans des conditions alcalines quand un bon groupe partant est présent en position β et les groupements alkoxy des polysaccharides peuvent être considérés comme de bons groupes partants (figure 28).

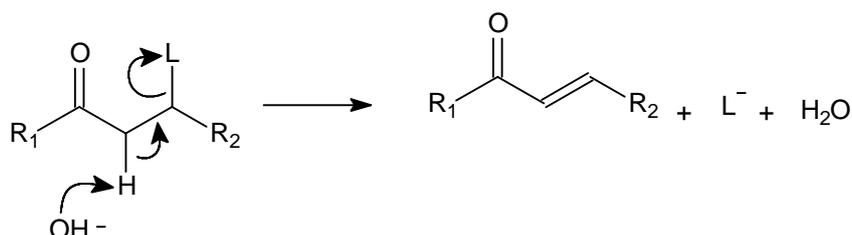


Figure 28 : Mécanisme de dégradation du polysaccharide par élimination en β dans des conditions alcalines

De plus, même si la réaction est très lente comparée à l'oxydation par le TEMPO [52], les hypochlorites et les hypobromites sont connus [56] pour oxyder les alcools secondaires dans des conditions alcalines.

Pour un pH trop faible, inférieur à 9, l'augmentation de la durée de la réaction a un effet négatif sur la sélectivité de la réaction. De plus, les hypobromites et les hypochlorites deviennent plus actives et moins sélectives entraînant des phénomènes de dégradation [57].

Un contrôle strict du pH s'avère donc nécessaire. Au final, un pH compris entre 9,2-9,7 a été choisi [57].

- **Durée de la réaction :**

Des temps de réactions importants ont généralement un effet négatif sur la sélectivité de la réaction. Un compromis doit donc être trouvé entre les différents facteurs pour que la réaction soit la plus rapide et la plus sélective tout en minimisant les processus de dégradation. La réaction est stoppée dès que l'addition d'hydroxyde de sodium pour ajuster le pH devient très lente.

- **Quantités de réactif :**

D'après le mécanisme d'oxydation, dans le système TEMPO-NaOCl-NaBr, l'oxydation d'une mole d'alcool primaire en acide carboxylique demande 2 moles d'oxydant primaire NaOCl.

Des études réalisées sur la cellulose ont mis en évidence une dépolymérisation importante pour des quantités supérieures à 0,07 équivalent en TEMPO associée à une très grande rapidité de la réaction [58]. Celle-ci serait causée par l'ouverture du cycle glycosidique, de façon irrégulière, accompagnant l'oxydation des OH-2 et OH-3 (figure 29).

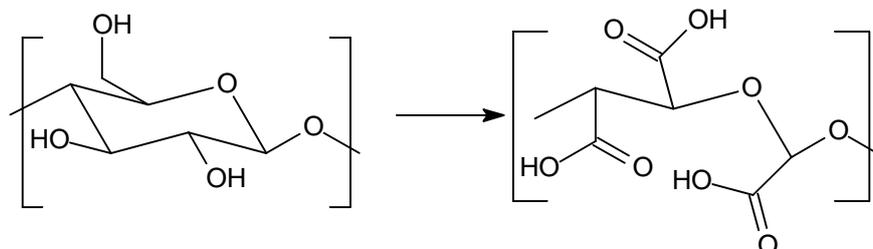


Figure 29 : Mécanisme de dégradation observé pendant l'oxydation pour de trop fortes quantités en TEMPO

En présence d'une plus grande quantité de NaBr, une vitesse de réaction aussi bonne peut être observée pour des quantités moins importantes de TEMPO mais la plus forte concentration d'hypobromites générée diminue la sélectivité pour les alcools primaires [52].

Les quantités de réactifs demandent donc une optimisation pour obtenir la meilleure sélectivité et l'absence de dégradation du polysaccharide.

Ainsi, le nombre d'équivalents de réactifs utilisés dans cette étude est le même que celui optimisé par De Nooy [57] lors de son étude sur les pullulanes soit environ : 0,02 équivalent en TEMPO, 0,2 équivalent en NaBr et 2,2 équivalents de NaOCl.

- **Réduction en fin de réaction :**

La réduction par le NaBH_4 permet de réduire les aldéhydes présents en fin de réaction quand l'oxydation n'est pas totale.

b) Analyses

- **Analyses infrarouges (IR)**

La comparaison des spectres IR de l'EPS natif et de l'EPS après oxydation permet de confirmer qu'il y a bien eu oxydation sélective des hydroxyles primaires avec :

- l'augmentation de la bande d'absorption à 1612 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation des carboxylates ;
- l'absence de bande d'absorption dans la région des 1730 cm^{-1} indiquant que l'échantillon ne contient pas de groupements carbonyles et que l'oxydation a donc bien été sélective des hydroxyles primaires.

- **Dosage des acides uroniques**

Le dosage des acides uroniques est réalisé selon le protocole initialement proposé par Blumenkrantz [59] et modifié par Tullia [60], figurant dans la partie expérimentale de la partie 1 de la thèse.

- Evaluation des masses molaires

La masse molaire exprimée en équivalents pullulanes permet d'estimer d'éventuelles modifications de la masse sur les chaînes polysaccharidiques. Cependant, l'apport de groupements carboxylates modifie considérablement la conformation et la charge globale de ce dérivé. La valeur de la masse donnée par ce système est donc erronée et ne permettra que d'avoir une tendance concernant la dégradation ou pas de l'EPS modifié.

c) Résultats et discussions

Les premières réactions d'oxydation de l'EPS natif et dépolymérisé sous ultrasons ont été réalisées dans les conditions figurant dans la littérature récente.

Les premières manipulations sur l'EPS natif ont été réalisées sur des échantillons concentrés (5g/l) et à 2°C. A cette température et à cette concentration, l'EPS HYD 657 en solution dans l'eau et en présence des différents réactifs a formé un gel. Les résultats des dosages n'ont pas mis en évidence la formation d'acides uroniques supplémentaires.

Par la suite, la réaction a été réalisée à 5°C et des solutions diluées (2g/L) ont été utilisées. Les résultats obtenus figurent dans le tableau 11.

EPS	% d'acides uroniques	% de fonctions alcools primaires oxydées	M _w (g/mol)	I _p	Rendement
Natif	30%	-	3 000 000	4	-
Natif oxydé (1)	52%	50	620 000	2,3	87
Natif oxydé (2)	45%	36	783 000	2	87
Dépolymérisé par ultrasons	30%	-	300 000	2,6	89
Dépolymérisé par US oxydé	43%	32	246 500	2,5	89

Tableau 11 : Résultats d'analyses du dosage des acides uroniques après oxydation par le système TEMPO-NaBr-NaOCl des échantillons natifs et dépolymérisés sous ultrasons

Des pourcentages de fonctions alcools primaires oxydées similaires, environ 35%, ont été obtenus, que l'EPS ait été ou non dépolymérisé au préalable. Par rapport aux résultats obtenus par de Nooy [52] sur des pullulanes dans, strictement, les mêmes conditions, nos résultats sont moins bons : l'oxydation des hydroxyles primaires n'est que partielle (entre 35 et 50%) et les échantillons finaux possèdent une masse molaire plus faible. Une dépolymérisation plus faible dans le cas d'un échantillon initialement partiellement dépolymérisé par les ultrasons a été observée. Deux des résultats des manipulations de reproductibilité de l'oxydation de l'EPS natif figurent dans le tableau 11. Ces résultats mettent en évidence que, pour une plus grande quantité d'alcools primaires oxydés une masse molaire M_w plus faible est obtenue.

La durée de la réaction peut probablement expliquer en partie ces résultats. Ainsi, la réaction de l'EPS HYD 657 est beaucoup plus lente, et semblait terminée après 180 minutes alors que dans le cas des pullulanes [52] l'oxydation est complète après 110 minutes. Cet allongement entraîne des phénomènes de dégradation même si, comme le montre les spectres IR obtenus, la réaction reste sélective.

En réalisant la manipulation dans les mêmes conditions que dans le cas du pullulane [52], nous n'avons pas tenu compte du caractère anionique de l'EPS HYD 657. En effet, l'oxydant réel lors de la réaction d'oxydation est le cation nitrosonium et l'EPS HYD 657 est polyanionique ce qui doit avoir un impact sur la vitesse de la réaction. La « disponibilité » de l'oxydant réel ne doit pas être la même dans le cas d'un polysaccharide chargé que dans celui d'un polysaccharide neutre. L'apport de sels doit également avoir un effet crucial. En effet, quand la force ionique augmente dans le mélange par l'ajout de sels, la force d'attraction coulombienne entre le cation nitrosonium et le polysaccharide anionique est masquée. Aussi, la concentration locale en cations nitrosonium le long de la chaîne est moins importante qu'elle devrait être conduisant très probablement à une diminution de la vitesse de la réaction.

Le nombre de moles de NaOH consommé par minute par le mélange réactionnel pour neutraliser les acides formés et maintenir ainsi le mélange à un pH donné reflète la vitesse de la réaction et a donc été représenté (figure 30). Deux phases peuvent être distinguées : une région dans laquelle la consommation est linéaire et dans laquelle la vitesse d'oxydation est constante, et une région asymptotique correspondant à une diminution de la vitesse de formation des acides carboxyliques. La pente de la région linéaire ($1,55 \mu\text{mol}/\text{min}$) permet de mesurer la vitesse d'oxydation et d'estimer le degré d'oxydation à 0,2 (maximum de 0,45 pour l'EPS HYD 657).

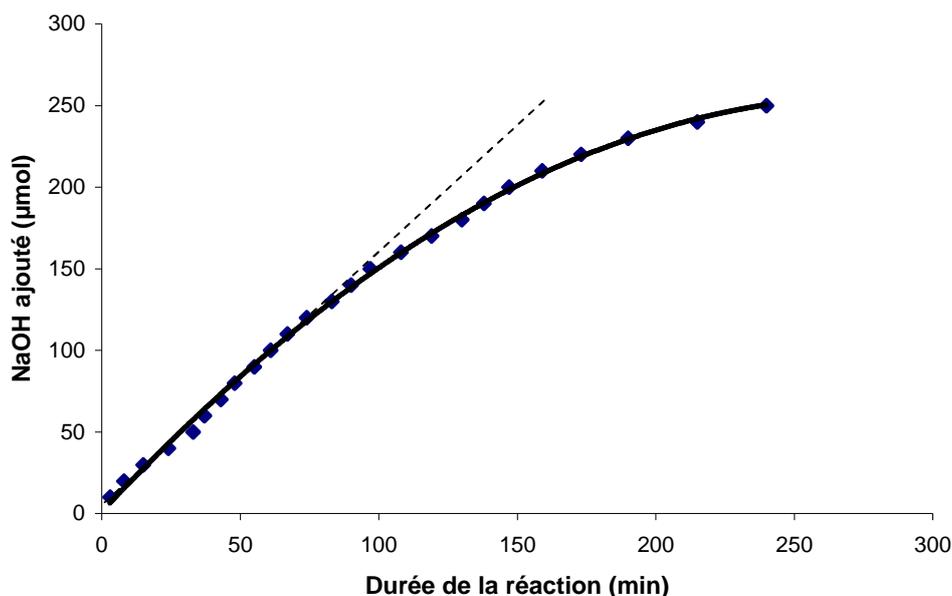


Figure 30 : Evolution de la consommation en NaOH (0,1N) pendant la réaction d'oxydation en fonction de la durée de la réaction

Par la suite, l'acétylation d'un échantillon natif oxydé a été réalisée. Le nombre de fonctions acétylées a été déduit par RMN par rapport à l'intégration des Rha, Fuc et Lac. 21 hydroxyles seraient acétylés contre environ 23 pour un échantillon natif non oxydé. L'oxydation de 2 à 3 alcools primaires (tableau 11) a donc eu les répercussions attendues avec une diminution des fonctions hydroxyles disponibles et donc du nombre de fonctions acétylées. L'acétylation s'est accompagnée d'une dépolymérisation de l'échantillon qui possède une M_w finale de 210 000 g/mol équivalente à celle obtenue sur les échantillons natifs en l'absence d'oxydation.

La réaction d'oxydation est complexe et les résultats obtenus dans la littérature dans le cas de polysaccharides neutres nécessitent une optimisation pour l'EPS HYD 657. Ainsi, par exemple, la vitesse de la réaction dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels l'attraction du cation nitrosonium pour le côté ionique de l'EPS est très probablement importante. Des études supplémentaires seront nécessaires pour adapter les quantités de réactifs à l'oxydation totale de l'EPS HYD 657 en limitant la dégradation de celui-ci. D'ores et déjà, un premier essai de modification chimique par acétylation a permis de mettre en évidence la répercussion de la diminution de fonctions alcools primaires disponibles sur le degré de substitution de l'EPS.

6- Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail la faisabilité de modulations chimiques de l'EPS HYD 657, natif ou dépolymérisé, par des groupements classiques a été vérifiée. Pour ce faire, des modes opératoires simples et efficaces ont été utilisés.

Des méthodes d'analyses permettant un suivi rapide de l'avancée des travaux et l'estimation des degrés de substitutions ont été mises en place. Ces méthodes ont d'ores et déjà permis une optimisation des conditions de certaines réactions. Ainsi, des suivis cinétiques des réactions de sulfatation et d'acétylation ont permis d'optimiser les durées de réactions afin d'avoir un degré de substitution maximum pour une dépolymérisation/dégradation la plus faible possible. Des fractions estérifiées par des chaînes grasses présentant de nouvelles propriétés physico-chimiques, insolubilité dans l'eau par exemple, ont également été obtenues.

Les premières fractions d'EPS HYD 657 modifiées par sulfatation, acétylation ou estérification par des chaînes grasses, obtenues de façon reproductible, permettront la réalisation de nouveaux criblages d'activités biologiques.

Cependant, nos travaux se sont également heurtés à la complexité de l'EPS HYD 657. En effet, des protocoles pourtant utilisés de façon classique dans la littérature pour la modification de polysaccharides plus simples tels que l'amidon, la cellulose ou le pullulane devront être adaptés au polysaccharide HYD 657. Ainsi, les résultats obtenus en phosphatation se sont montrés difficiles à caractériser tout comme l'ajout de groupement cationique. De même, de moins bons résultats ont été obtenus par rapport à ceux de la littérature avec une oxydation seulement partielle des hydroxyles secondaires.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, des polymères présentant une structure moins complexe devront, probablement, être utilisés dans un premier temps.

Sulfatation de l'EPS HYD 657

Protocole type utilisé lors de l'ajout d'un complexe SO₃

Les protocoles suivant sont représentatifs des protocoles utilisés. Selon les manipulations, seule la nature des réactifs ou des solvants a changé.

- **Mise sous forme de sel du polysaccharide**

60 mg d'EPS sont solubilisés dans 10 ml d'eau Elix. L'EPS est mis sous forme H⁺ par élution sur colonne de résine échangeuse d'ions Dowex Marathon.

L'élution est réalisée avec de l'eau Elix, environ un volume de colonne, et l'éluat est collecté tant que le pH reste acide. Le pH est ensuite immédiatement ajusté à 6,5 avec la base choisie (pyridine, soude...). L'EPS est alors congelé puis lyophilisé.

- **Sulfatation de l'EPS avec le complexe pyridine-SO₃**

60 mg d'EPS sous forme de sel de pyridinium sont dissous dans 25 ml de DMF anhydre sous agitation pendant 1h à température ambiante et sous azote, en présence de tamis moléculaire. Lorsque la solution est parfaitement limpide, 300 mg de complexe Pyr-SO₃, soit 5 fois la masse du polysaccharide, sont ajoutés. Le mélange est chauffé 24h sous agitation puis transféré dans un bêcher sans le tamis. La réaction est alors stoppée par addition de 2 ml d'eau Elix. Le pH est ajusté à 9 par ajout de NaOH 1M.

Le mélange est ensuite placé dans un boudin de dialyse et dialysé une nuit contre de l'eau du robinet puis trois fois pendant 24h contre de l'eau Elix.

Le contenu des boudins est filtré si la présence de particules insolubles est observée, puis congelé à -20°C et lyophilisé.

- **Protocole type avec l'acide chlorosulfonique**

60 mg d'EPS mis sous forme de sel de pyridinium sont dissous dans 10 ml de pyridine fraîchement distillée à température ambiante sous azote en présence de tamis moléculaire pendant une nuit.

10 ml de pyridine fraîchement distillée sont placés à -15°C. 2 ml d'HCISO₃H sont ajoutés goutte à goutte sous faible agitation. La solution d'EPS est ensuite ajoutée goutte à goutte à ce mélange. Le milieu réactionnel est ensuite porté à 70°C pendant environ 5h. Le mélange est laissé à refroidir puis versé dans 20 ml d'eau après l'avoir séparé du tamis moléculaire. Le pH est ensuite amené à 9 par ajout de NaOH.

Le mélange est ensuite placé dans un boudin de dialyse. Il est une nuit contre de l'eau du robinet puis trois fois pendant 24h contre de l'eau Elix.

Le contenu des boudins est filtré, si la présence de particules insolubles est observée, puis congelé à -20°C et lyophilisé.

Aspect : « ouate » beige

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3200-3400 (vibration d'élongation des OH) ; 2930 (vibration d'élongation antisymétrique des CH_2) ; 2845 (vibration d'élongation symétrique des CH_2) ; 1740 (vibration d'élongation des C=O des acides carboxyliques) ; 1640-1650 (vibration d'élongation des C=O) ; 1455 (vibration de déformation des CH_2) ; 1400-1450 (vibration d'élongation des C=O des carboxylates, vibration de déformation des OH des alcools, vibration de déformation des C=O des acides carboxyliques) ; 1230-1250 (vibration d'élongation antisymétrique des S=O, vibration de déformation des C=O des acides carboxyliques) ; 1130-1150 (vibration d'élongation des C-O-C) ; 950-1100 (vibration du squelette polysaccharidique) ; 820 (vibration symétrique des C-O-S).

Phosphatation de l'EPS HYD 657

Protocole type utilisé lors de la phosphatation

7,5 g d'urée sont mis en solution dans 30 ml de DMF. Une solution limpide est obtenue en chauffant à 100°C sous agitation magnétique. 200 mg d'EPS sont ajoutés à cette solution et le mélange est porté à 120°C.

Lorsque le polymère est dissous, 1,25 ml d'acide orthophosphorique est ajouté. Le mélange est maintenu à 120°C sous agitation pendant 3h30. Après refroidissement, le DMF et l'urée sont éliminés par 4 rinçages avec 50 ml de méthanol. Le précipité est séché sous azote et repris dans 20 ml d'eau Elix. Cette solution est dialysée une nuit contre de l'eau du robinet puis 3 fois 24h contre de l'eau Elix. Le contenu des boudins est congelé à -20°C et lyophilisé.

Aspect : Poudre blanche

Rendement massique: 65-90%

RMN ³¹P (D₂O, 162 MHz) δ (ppm) : de -11 à -5 (m, diphosphodiester) ; 0-5 (m, phosphomonoester)

IR (KBr) ν(cm⁻¹) : 1710 (vibration d'élongation des C=O des amides); 1150-1185 (vibration d'élongation des P=O); 1130-1150 (vibration d'élongation des C-O-C); 950-1055(vibration du squelette polysaccharidique, vibration d'élongation des C-O-P).

Analyses élémentaires : % \bar{P} = 5,5

Ajout de groupements bétainates sur l'EPS HYD 657

Protocole type utilisé

A une solution d'EPS natif mis sous forme de sels de pyridinium (87 mg, 0,52 mmol) et d'hydrochlorure de bétaine (28,4 mg, 0,185 mmol) en solution dans du DMF anhydre (30 ml) sont ajoutés successivement du DCC (171 mg, 0,83 mmol) et de la DMAP (22,6 mg, 0,185 mmol). Le mélange est laissé une nuit sous agitation, à température ambiante et sous azote.

La réaction est stoppée par ajout d'un millilitre d'eau.

50 ml de méthanol sont alors ajoutés au mélange et la suspension est centrifugée. Le précipité est lavé 3 fois à l'éthanol. Le mélange est dialysé une nuit contre de l'eau du robinet additionné de NaCl (1,5 g/L) puis contre de l'eau Elix.

^ la masse molaire a été calculée à partir de l'hypothèse de structure de l'EPS HYD 657

Aspect : Poudre blanche

Rendement : 85 %

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1756 cm^{-1} (vibration d'élongation des C=O des bétainates)

RMN ^1H (D_2O , 400 MHz) δ (ppm) : 3-6 (squelette polysaccharidique de l'EPS, massif) ; 4,7 (eau, s) ; de 3,2 (CH_3 bétainate, s) ; 1,2-1,5 (CH_3 des rhamnoses et des fucoses).

RMN ^{13}C CP-MAS δ (ppm) : 182 (CO, lactate) ; 165 (C=O, bétaine) ; 103,6 (C1, Gal, Glu, Rha et GlcA) ; 99,1 (C1, GalA et Man) ; 73,3 (C2, C3 et C5, squelette polysaccharidique) ; 62,6 (C6, Glc) ; 20 (CH_3 , Rha, Fuc et Lac).

Acétylation de l'EPS HYD 657

Protocole type utilisé lors de la réaction d'acétylation

90 mg (0,54 mmol^{*}, 1 éq) d'EPS natif mis sous forme de sels de pyridinium sont dissous dans 30 ml de DMF anhydre, sous azote et à température ambiante. Après dissolution, la solution est portée à 45°C avant ajout de 2 ml (10,5 mmol, 39 éq) d'anhydride acétique et 1 ml (12,4 mmol) de pyridine.

Le mélange est laissé 48h sous agitation et sous azote à 40°C.

A la fin de la réaction, 2 ml d'eau Elix sont ajoutées au mélange. Le mélange est ensuite dialysé (membranes 12-14 000 g/mol Spectrapor) 24 h contre de l'eau du robinet additionnée de 400 mg/L de NaN₃ puis 48h contre de l'eau Elix. Le mélange est enfin congelé puis lyophilisé.

* la masse molaire a été calculée à partir de l'hypothèse de structure de l'EPS HYD 657

Aspect : « ouate » beige

Rendement massique : > 100%

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1750 (vibration d'élongation des C=O) ; 1375 (vibration de déformation des CH₃) ; 604 (vibration des O-C=O).

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm) : 3-6 (squelette polysaccharidique de l'EPS, massif) ; 4,7 (H₂O, s) ; de 1,6-2,4 (CH₃, acétals) ; 1,2-1,5 (CH₃, Rha, Fuc et Lac).

RMN ¹³C CP-MAS : 182 (CO, lactate) ; 172 (C=O, acétyle) ; 103,6 (C1, Gal, Glu, Rha et GlcA) ; 99,1 (C1, GalA et Man) ; 73,3 (C2, C3 et C5, squelette polysaccharidique) ; 62,6 (C6, Glc) ; 20,8 (CH₃, acétyles).

DA~2,4

Estérification par une chaîne grasse de l'EPS HYD 657

Le protocole et les résultats présentés correspondent à l'échantillon sur lequel nous nous sommes focalisés pour réaliser la majorité des analyses. Il s'agit de l'échantillon dépolymérisé sous ultrasons à Grenoble (partie 1) de $M_w \approx 300\,000$ g/mol puis estérifié par une chaîne en C10.

81 mg (0,48 mmol) d'EPS dépolymérisés sous ultrasons mis sous forme de sels de pyridinium sont dissous dans 25 ml de DMF anhydre. 2 ml (9,6 mmol, 20 équivalents) de chlorure de décanoyle et 1 ml de pyridine (12,4 mmol) sont ajoutés à l'EPS en solution. Le mélange est laissé sous agitation et sous azote à 45°C pendant 48h. 1 ml d'eau Elix est ajouté en fin de réaction.

Plusieurs lavages de la phase organique contre NaCl saturé permettent d'éliminer les sels de chlorure de pyridinium et de revenir sous forme de sels de Na^+ . La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 .

L'ajout de 50 ml de méthanol permet la reprécipitation en masse du composé. Le solide obtenu est lavé plusieurs fois à l'éthanol chaud (2x30 ml) puis à l'éther éthylique (5x30 ml). Le précipité est ensuite séché sous vide.

Aspect : Poudre marron

Rendement molaire : 65%

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3022 (vibration de déformation des CH_3 ; 2850-2950 (vibration de déformation des CH_2); 1750 (vibration d'élongation des $\text{C}=\text{O}$ des esters).

RMN ^1H HR-MAS : (Pyridine- d_5 , 500 MHz) δ (ppm) : 3-6 (squelette polysaccharidique de l'EPS, patate) ; 4,7 (eau, s) ; 2,2 (CH_2 en α des $\text{C}=\text{O}$) ; 1,2-1,7 (CH_2 des esters, CH_3 des Rha, Fuc et Lac) ; 0,85 (CH_3 terminal des esters).

RMN ^{13}C CP-MAS : 182 (CO, lactate) ; 172 ($\text{C}=\text{O}$, ester) ; 90-110 (C1, squelette polysaccharidique) ; 73,3 (C2, C3 et C5, squelette polysaccharidique) ; 62,6 (C6, Glc) ; 10-50 (C aliphatiques, chaînes grasses).

Analyses élémentaires :

Formule théorique proposée (sels de pyridinium): $\text{C}_{264}\text{H}_{446}\text{O}_{75}\text{N}_3$

Résultats théoriques			Analyses élémentaires		
%C	%H	%N	%C	%H	%N
65,23	9,18	0,86	65,35	9,15	0,79

Oxydation sélective des hydroxyles primaires de l'EPS HYD 657

Protocole type utilisé lors de la réaction d'acétylation

100 mg d'EPS (0,59 mmol, 1 éq) sont dissous dans 50 ml d'eau distillée à température ambiante. 2 mg de TEMPO (0,013 mmol, 0,02 éq) et 10 mg de NaBr (0,19 mmol, 0,2 éq) sont ajoutés à la solution, le mélange est refroidi dans un bain de glace. 2 ml d'une solution à 5% d'hypochlorite (~1,25 mmol, 2,2 éq) sont amenés à un pH de 9,4 par ajout d'HCl 0,1N et également placés dans un bain de glace.

Les solutions sont mélangées et le pH est maintenu à 9,4 pendant toute la réaction d'oxydation par l'ajout de NaOH_{aq} 0,1N. Un bain de glace est utilisé pour maintenir une température d'environ 5°C dans le ballon.

Quand l'addition d'hydroxyde de sodium devient très lente, après 180 min, la réaction est stoppée par l'ajout de 2 ml de méthanol. La réaction est ensuite neutralisée par ajout d'une solution d'HCl 1N.

50 mg (1,3 mmol) de NaBH₄ sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation une nuit. Le mélange est ensuite amené à pH 6 par ajout d'HCl 1N. Le polysaccharide oxydé est purifié par ultrafiltration (membrane Amicon en acétate de cellulose, seuil de coupure de 500 Da), puis lyophilisé.

Aspect : « ouate » blanche

Rendement massique : 87%

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1612 (vibration d'élongation des COO⁻)

% d'alcools primaires oxydés : 45

M_w \approx 700 000 g/mol en équivalent pullulanes

- 1- Yalpani M. (1985). A survey of recent advances in selective chemical and enzymic polysaccharide modifications. *Tetrahedron*, 41(15), 2957-3020.
- 2- Yalpani M. (1999). Chemistry of polysaccharide modification and degradation. In *Carbohydrate ; structure, synthesis and dynamics*. Finch P. (editor). Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 294-318.
- 3- Hebeish A., El-Aref A.T. (1978). Improvements of cellulose properties by chemical modification. *Kolorisztikai Ertesito*, 20(4), 180-204.
- 4- Tomasik P., Schilling C.H. (2004). Chemical modification of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 59, 175-403.
- 5- Shingel K.I. (2004). Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate research*, 339(3), 447-60.
- 6- Beck R.H., Fitton M.G., Kricheldorf H.R. (1992). Chemical modification of polysaccharides. In : *Handbook of polymer synthesis*. New York: Marcel Dekker Publisher, 1538.
- 7- Manoni M., Miletti S., Cipoletti G., Abbate R., Gori M.A. (2003). O-Sulfated bacterial polysaccharides and their use. Brevet US2003232785. 2003-12-18.
- 8- Zoppetti G., Oreste P., Cipolletti G. (1998). O-Sulfated bacterial polysaccharides. Brevet WO9834958. 1998-08-13.
- 9- Nishino T., Nagumo T. (1992). Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. *Carbohydrate Research*, 229(2), 355-362.
- 10- Guezennec J., Pignet P., Lijour Y., Gentric E., Ratiskol J., Collic-Jouault S. (1998). Sulfation and depolymerization of a bacterial exo-polysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydrate Polymers*, 37(1), 19-24.
- 11- Collic-Jouault S., Chevotot L., Helley D., Ratiskol J., Bros A., Siquin C., Roger O., Fischer A.M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528(2-3), 141-151.
- 12- Geresh S., Mamontov A., Weinstein J. (2002). Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50(2-3), 179-187.
- 13- Lloyd P.F., Evans B. (1969). Determination of sulphate of barium in carbohydrate sulphates by flame photometry. *Carbohydrate Research*, 11(1), 129-136.
- 14- Lijour Y., Gentric E., Deslandes E., Guezennec J. (1994). Estimation of the sulfate content of hydrothermal vent bacterial polysaccharides by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 220(2), 244-248.
- 15- Roger O. (2002). Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de Doctorat de l'Université de Paris 13.
- 16- Alban S., Jeske W., Welzel D., Franz G., Fareed J. (1995). Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β -1-3glucan sulphate. *Thrombosis Research*, 78, 201-210.
- 17- Yang J., Du Y., Wen Y., Li T., Hu L. (2003). Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. *Carbohydrate Polymers*, 52, 397-403.
- 18- Takano R., Yoshikawa S., Ueda T., Hayashi K., Hirase S., Hura S. (1996). Sulfation of polysaccharides with sulphuric acid and mediated by dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of carbohydrate chemistry*, 15(4), 449-457.

- 19- Geresh A., Mamontov A., Weinstein J. (2002). Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50, 179-187.
- 20- Petit E., Papy-Garcia D., Muller G., Courtois B., Caruelle J.P., Courtois J. (2004). Controlled sulfation of natural anionic bacterial polysaccharides can yield agents with specific regenerating activity in vivo. *Biomacromolecules*, 5, 445-452.
- 21- Mihai D., Mocanu G., Carpov A. (2001). Chemical reactions on polysaccharides I. Pullulan sulfation. *European Polymer Journal*, 37(3), 541-546.
- 22- Kaliannan P., Gomiha M.M., Elanthiraiyan M. (2001). Solvent accessibility studies on polysaccharides. *International Journal of biological Macromolecules*, 28(2), 135-141.
- 23- St.-Jacques M., Sundararajan P.R., Taylor K.J., Marchessault R.H. (1976). Nuclear magnetic resonance and conformational studies on amylose and model compounds in dimethyl sulfoxide solution. *Journal of the American Chemical Society*, 98(15), 4386-91.
- 24- Schultz C. (2003). Prodrugs of biologically active phosphate esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11, 885-898.
- 25- Dace R., McBride E., Brooks K., Gander J., Buszko M., Doctor V.M (1997). Comparison of the anticoagulant action of sulphated and phosphorylated polysaccharides. *Thrombosis Research*, 87(1), 11-121.
- 26- Heinze U., Klemm D., Unger E., Pieschel F. (2003). New starch phosphate carbamides of high swelling ability : synthesis and characterization. *Starch*, 55, 55-60.
- 27- Khanal D.R, Okamoto Y., Miyatake K., Shinobu T., Shigemasa Y., Tokura S., Minami S. (2001). Protective effects of phosphated chitin (P-Chitin) in a mice model of acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Carbohydrate Polymer*, 44, 99-106.
- 28- Wan Y, Creber K.A.M., Peppley B., Bui V.T. (2003). Synthesis, characterization and ionic conductive properties of phosphorylated chitosan membranes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 204, 850-858.
- 29- Ames B.N. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In *Methods in enzymology*, Vol. VIII, Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds), 115-118.
- 30- Sacco D., Klett-Zygmunt D., Dellacherie E. (1988). A re-investigation of the phosphorylation of dextran with polyphosphoric acid: evidence for the formation of different types of phosphate moieties. *Carbohydrate Research*, 184, 193-202.
- 31- Khalil M.I., Farag S., Aly A.A., Hebeish A. (2002). Some studies on starch-urea-acid reaction mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 48, 255-261.
- 32- Solarek D.B.. In: Wurzburg OD, editor. Modified starches: properties and uses. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986:113.
- 33- Floch V., Legros N., Loisel S., Guillaume C., Guilbot J., Benvegnu T., Ferrieres V., Plusquellec D., Ferec C. (1998). New biocompatible cationic amphiphiles derivative from glycine betaine: a novel family of efficient nonviral gene transfer agents. *Biochemical and biophysical research communications*, 251(1), 360-5.
- 34- Dubief C., Rinaudo M., Auzely-Velty R. (2003). Production of polysaccharide betaïnates useful in cosmetic and dermatological compositions comprises e.g. reacting a polysaccharide with a dialkylamino carboxylic acid and quaternizing the product. Brevet FR2832156. 2003-05-16.

- 35- Horstmann C., Kraus C., Faurie R., Thomas L. (2002). Beneficial uses of betaine (trimethylglycine) in nutraceuticals and cosmetics. *Nutraceuticals*, 1, 2-5.
- 36- Auzély-Velty R., Rinaudo M. (2003). Synthesis of starch derivatives with labile cationic groups. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 123-129.
- 37- Sánchez-Chaves M., Arranz F. (1997). Preparation of dextran-bioactive compound adducts by the direct esterification of dextran with bioactive carboxylic acids. *Polymer*, 38(10), 2501-2505.
- 38- Rastrelli A., Miglierini G., Perbellini A., Stucchi L. (2003). Polysaccharidic esters of retinoic acid useful for cosmetic and pharmaceutical formulations with reduced irritation. Brevet WO2003008457. 2003-01-30.
- 39- Rinaudo M. (2004). Role of substituents on the properties of some polysaccharides. *Biomacromolecules*, 5, 1155-1165.
- 40- Kurita K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, 26, 1921-1971.
- 41- Tsuboi M. (1988). Cosmetic containing acetylated saccharides. Brevet JP63287710. 1988-11-24.
- 42- Jeong Y.I., Nah J.W., Na H.K., Na K., Kim I.S., Cho C.S. (1999). Self-assembling nanospheres of hydrophobized pullulans in water. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(8), 917-927.
- 43- Fang J., Fowler P., Tomkinson J., Hill C.A.S. (2002). The preparation and physical characterisation of modified soybean polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1523-1527.
- 44- Aburto J., Alric I., Thiebaud S., Borredon E., Bikiaris D., Prinós J., Panayiotou C. (1999). Synthesis, characterization, and biodegradability of fatty esters of amylase and starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 74, 1440-1451.
- 45- Miglierini G., Stucchi L., Perbellini A., Rastrelli A. (2003). Polysaccharide esters of retinoic acid. Brevet WO03008457. 2003-01-30.
- 46- Calucci L., Forte C., Gallechi L., Geppi M., Ghiringhelli S. (2003). ¹³C and ¹H solid state NMR investigation of hydration effects on gluten dynamics. *International journal of biological macromolecules*, 32(3-5), 179-189.
- 47- Yackel E.C., Kenyon W.O. (1942). The oxidation of cellulose by nitrogen dioxide. *Journal of the American Chemical Society*, 64(1), 121-127.
- 48- Painter T.J. (1977). Preparation and periodate oxidation of C-6-oxycellulose: conformational interpretation of hemiacetal stability. *Carbohydrate Research*, 55(1), 95-103.
- 49- Aspinall G.O., Nicolson A. (1960). Catalytic oxidation of European larch ϵ -galactan. *Journal of the Chemical Society, Abstracts*, 2503-2507.
- 50- Semmelhack M.F., Chou C.S., Cortès D.A. (1983). Nitroxyl-mediated electrooxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *Journal of the American Chemical Society*, 105(13), 4492-4494.
- 51- Semmelhack M.F., Schmid C.R., Cortès D.A. (1986). Mechanism of the oxidation of alcohols by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine nitrosonium cation. *Tetrahedron letters*, 27(10), 1119-1122.
- 52- De Nooy A.E.J., Besemer A.C., van Bekkum (1995). Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydrate Research*, 269, 89-98.
- 53- Jiang B., Drouet E., Milas M., Rinaudo M. (2000). Study on TEMPO-mediated selective oxidation of hyaluronan and the effects of salt on the reaction kinetics. *Carbohydrate Research*, 327, 455-461.

- 54- Besemer A.C., van Bekkum H. (1994). Dicarboxy-starch by sodium hypochlorite/bromide oxidation and its calcium-binding properties. *Starch*, 46(3), 95-106.
- 55- Lindberg, B.; Lönngrén J., Svensson J. (1975). Degradation of polysaccharides. *Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 31, 185-240.
- 56- Floor M., Kieboom A.P.G., van Bekkum H. (1989). Preparation and calcium complexation of oxidized polysaccharides. Part I: Oxidation of maltodextrins and starch with alkaline sodium hypochlorite. *Starch*, 41(8), 348-354.
- 57- De Nooy A.E.J., Besemer A.C., van Bekkum H., van Dijk J.A.P.P., Smit J.A.M. (1996). TEMPO-mediated oxidation of pullulan and influence of ionic strength and linear charge density on the dimensions of the obtained polyelectrolyte chains. *Macromolecules*, 29, 6541-6547.
- 58- Habibi Y. (2004). Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de Barbarie. Les polysaccharides pariétaux : caractéristiques et modifications chimiques. Thèse de Doctorat de l'Université de Grenoble 1.
- 59- Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids, *Analytical Biochemistry*, 54, 484-489.
- 60- Tullia M., Filisetti-Cozzi C., Carpita N.C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *Analytical Biochemistry*, 197, 157-162.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif essentiel de ce travail était de modifier l'EPS HYD 657 natif afin d'obtenir de nouvelles fractions actives permettant d'élargir le champ d'application de cet exopolysaccharide dans le domaine des cosmétiques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la réduction de la masse molaire de l'EPS natif. Deux méthodes ont été développées et comparées au laboratoire, respectivement par catalyse métallique et celle par irradiation ultrasonique.

Après détermination des facteurs les plus pertinents en dépolymérisation par les ultrasons, à savoir la concentration, la température et la durée d'exposition aux ultrasons, ceux-ci ont été adaptés à la dépolymérisation de l'EPS HYD 657. Cette étude a également permis de mettre en évidence une amélioration de l'efficacité de la dépolymérisation sous ultrasons par ajout d'H₂O₂, jamais décrite à notre connaissance. Cette combinaison originale des voies physique et chimique de dépolymérisation à basse fréquence a fait l'objet d'une demande de brevet. Une première étude d'extension d'échelle a permis de vérifier la faisabilité du process à une échelle petit pilote de 10 litres.

La voie chimique de dépolymérisation par catalyse métallique avait déjà fait l'objet d'études à l'Ifremer. Cette étude plus poussée sur l'EPS HYD 657 a abouti à un meilleur contrôle de l'efficacité et surtout de la reproductibilité de cette réaction complexe par détermination des facteurs les plus influents. De plus, des métaux n'ayant, à notre connaissance, pas fait l'objet d'études dans la littérature, le zinc et le manganèse, et des mélanges de métaux, ont été utilisés. Les mécanismes mis en jeu sont complexes mais des observations des modifications de la composition chimique ont permis de dresser de premières hypothèses sur les sites de rupture mis en jeu.

Les échantillons variés obtenus ont, par la suite, fait l'objet de criblages d'activités biologiques. Ces premiers tests réalisés *in vitro* ont permis de mettre en évidence la possibilité d'activités biologiques dans le domaine visé des cosmétiques avec, pour certaines fractions des effets immotivants, des effets anti-radicalaires et/ou des effets amincissants. Ces premiers résultats forts encourageants devront être confortés, pour chaque effet recherché, par des tests plus poussés sur les fractions les plus actives.

Par la suite, l'EPS HYD 657, sous forme native et dépolymérisée, a été modifié chimiquement par ajout de groupements usuels afin de lui conférer de nouvelles propriétés et d'obtenir un panel de nouvelles molécules. Des protocoles simples, dont l'extrapolation à une échelle industrielle semble facilement réalisable, ont été utilisés. Les méthodes de caractérisation choisies (IR, RMN, dosages colorimétriques) ont permis un suivi facile et rapide pour certaines des modifications réalisées telles que la sulfatation, l'estérification ou l'oxydation. Pour les réactions dont les mécanismes sont plus complexes (phosphatation) ou dont les conditions de réaction sont plus délicates à mettre en œuvre, une meilleure compréhension des phénomènes mise en jeu et l'optimisation des manipulations

passera probablement par l'utilisation , dans un premier temps, de polymères présentant des structures plus simples.

L'extrême originalité et complexité de la structure de l'EPS HYD 657 combinée aux modifications chimiques représentent une source importante de nouvelles molécules bioactives. De nouveaux tests de criblages d'activités biologiques seront nécessaires afin de déterminer le potentiel des nouvelles molécules synthétisées au cours de ce projet.

Les travaux décrits dans cette thèse font actuellement l'objet de :

✓ **Publications :**

1- Petit A-C, Noiret N., Siquin C., Ratiskol J., Guezennec J., Collic-Jouault S. (2005). Free-radical depolymerization with metallic catalysts of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Carbohydrate Polymers* [acceptée, sous presse]

2- Petit A-C, Noiret N., Guézennec J., Gondrexon N., Collic-Jouault S. (2005). Ultrasonic depolymerization of an exopolysaccharide produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. [soumise]

✓ **Demande de brevet :**

Petit A-C, Noiret N., Guezennec J., Collic-Jouault S. (2005). Procédé de dépolymérisation de polysaccharides par ultrasons [demande de brevet en France n° 05 10379 déposée le 11 octobre 2005 aux noms de l'Ifremer, l'ENSCR et Atrium Biotechnologies]

VU :

Le Directeur de Thèse


S. Collier

VU :

Le Responsable de l'École Doctorale



VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le 12 DEC. 2005

D^e UR/2005/S/12 n°292

Le Président de l'Université de Rennes 1

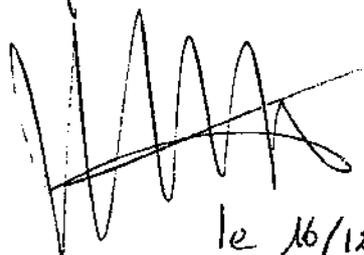


Bertrand FORTIN

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président du Jury,

Professeur Henri PATIN



le 16/12/05

ABSTRACT

This thesis reports the modification of a bacterial exopolysaccharide (EPS), the EPS HYD 657, from deep-sea hydrothermal origin. This $1.8 \cdot 10^6$ g/mol polysaccharide is composed of neutral sugars (40-50%) along with acidic sugars (30-40%). The repeating unit is thought to be an undecasaccharide with three small side chains. The native EPS was shown to present biological interest with applications in the manufacture of cosmetics for its abilities to enhance the skin immune defence system.

In order to extend its area of interest, we have carried out investigations to obtain low-molecular-weight fractions from this high-molecular-weight EPS.

The first part describes the depolymerization of the EPS HYD 657 by a physical way, the ultrasonic depolymerization. The factors the most relevant were determined at a laboratory scale before checking the feasibility and the transposability of these first results at a larger scale (10 L).

The second part deals with a chemical way of depolymerization of our EPS : the free-radical depolymerization with metallic catalysts. A large study was realized in order to determine the influential factors for a better control of the efficiency and the reproducibility of the experiments.

The potential of depolymerized fractions was explored by a screening of biological activities in the field of cosmetic. The results are described in a third part.

The last part of this thesis is devoted to preliminary studies about feasibility of chemical modification of the exopolysaccharide, native or depolymerized. Thus, the addition of charged groups, esterification reactions and oxidation reactions were realized. Some results about characterisation and quantification of the modifications by adapted analysis techniques to each experiment are described.

Key-words :

- ✓ exopolysaccharide
- ✓ deep-sea hydrothermal
- ✓ sonochemistry
- ✓ metallic catalysts
- ✓ depolymerization
- ✓ esterification
- ✓ sulfation
- ✓ oxidation

RESUME

Le travail présenté dans ce mémoire concerne la modification d'un exopolysaccharide (EPS), l'HYD 657, biosynthétisé par une bactérie issue des écosystèmes hydrothermaux profonds. Ce polysaccharide d'un poids moléculaire de $1,8 \cdot 10^6$ Da est composé de 40-50% d'oses neutres et de 30-40% d'acides uroniques. L'hypothèse de structure la plus probable décrit son unité de répétition comme un undécasaccharide possédant 3 ramifications courtes. Cet EPS, sous sa forme native, a déjà fait l'objet d'une étude approfondie en vue d'applications dans le domaine de la cosmétique pour ses propriétés apaisantes en application topique cutanée.

Pour élargir le spectre d'applications de cet EPS, la réduction de sa masse molaire a été envisagée.

La première partie décrit la dépolymérisation de l'EPS HYD 657 par une voie physique, les ultrasons. Les facteurs les plus pertinents ont été déterminés à l'échelle du laboratoire avant une première étude d'extension d'échelle afin de vérifier la faisabilité du process à une échelle petit pilote (10 L).

La seconde partie présente une voie chimique de dépolymérisation de notre EPS : la catalyse métallique. Une étude poussée a été réalisée afin de déterminer les facteurs influents pour un meilleur contrôle de l'efficacité et de la reproductibilité des manipulations.

Les résultats des criblages d'activités biologiques des échantillons dépolymérisés dans le domaine visé des applications cosmétiques sont présentés dans une troisième partie.

La dernière partie du mémoire est consacrée à la faisabilité de modifications chimiques de l'EPS, natif ou dépolymérisé. Ainsi, l'ajout de groupements chargés, des réactions d'estérifications et d'oxydation ont été réalisés. Des résultats de caractérisation et de quantification des modifications par des techniques d'analyses adaptées à chaque manipulation sont présentés.

Mots clefs :

- ✓ exopolysaccharide
- ✓ source hydrothermale
- ✓ ultrasons
- ✓ catalyse métallique
- ✓ dépolymérisation
- ✓ estérification
- ✓ sulfatation
- ✓ oxydation